

Thromboxan B₂
und 2,3 dinor-Thromboxan B₂
in Serum und Urin:
Physiologische, pathophysiologische
und pharmakologische Untersuchungen

Hubert Meier

Disbui. München

1987

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Thromboxan B_2 und 2,3 dinor-Thromboxan B_2 in Serum und Urin:
Physiologische, pathophysiologische und pharmakologische
Untersuchungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hubert Meier
aus München
Jahr 1987

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. C. Weber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Prof. Dr. H. Kampffmeyer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.6.1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Einleitung

meinem Paten Moritz Sappl gewidmet

1.1	Einleitung	1
1.2	Einleitung	1
1.3	Einleitung	1
1.4	Einleitung	1
1.5	Einleitung	1
1.6	Einleitung	1
1.7	Einleitung	1
1.8	Einleitung	1
1.9	Einleitung	1
1.10	Einleitung	1
1.11	Einleitung	1
1.12	Einleitung	1
1.13	Einleitung	1
1.14	Einleitung	1
1.15	Einleitung	1
1.16	Einleitung	1
1.17	Einleitung	1
1.18	Einleitung	1
1.19	Einleitung	1
1.20	Einleitung	1
1.21	Einleitung	1
1.22	Einleitung	1
1.23	Einleitung	1
1.24	Einleitung	1
1.25	Einleitung	1
1.26	Einleitung	1
1.27	Einleitung	1
1.28	Einleitung	1
1.29	Einleitung	1
1.30	Einleitung	1
1.31	Einleitung	1
1.32	Einleitung	1
1.33	Einleitung	1
1.34	Einleitung	1
1.35	Einleitung	1
1.36	Einleitung	1
1.37	Einleitung	1
1.38	Einleitung	1
1.39	Einleitung	1
1.40	Einleitung	1
1.41	Einleitung	1
1.42	Einleitung	1
1.43	Einleitung	1
1.44	Einleitung	1
1.45	Einleitung	1
1.46	Einleitung	1
1.47	Einleitung	1
1.48	Einleitung	1
1.49	Einleitung	1
1.50	Einleitung	1
1.51	Einleitung	1
1.52	Einleitung	1
1.53	Einleitung	1
1.54	Einleitung	1
1.55	Einleitung	1
1.56	Einleitung	1
1.57	Einleitung	1
1.58	Einleitung	1
1.59	Einleitung	1
1.60	Einleitung	1
1.61	Einleitung	1
1.62	Einleitung	1
1.63	Einleitung	1
1.64	Einleitung	1
1.65	Einleitung	1
1.66	Einleitung	1
1.67	Einleitung	1
1.68	Einleitung	1
1.69	Einleitung	1
1.70	Einleitung	1
1.71	Einleitung	1
1.72	Einleitung	1
1.73	Einleitung	1
1.74	Einleitung	1
1.75	Einleitung	1
1.76	Einleitung	1
1.77	Einleitung	1
1.78	Einleitung	1
1.79	Einleitung	1
1.80	Einleitung	1
1.81	Einleitung	1
1.82	Einleitung	1
1.83	Einleitung	1
1.84	Einleitung	1
1.85	Einleitung	1
1.86	Einleitung	1
1.87	Einleitung	1
1.88	Einleitung	1
1.89	Einleitung	1
1.90	Einleitung	1
1.91	Einleitung	1
1.92	Einleitung	1
1.93	Einleitung	1
1.94	Einleitung	1
1.95	Einleitung	1
1.96	Einleitung	1
1.97	Einleitung	1
1.98	Einleitung	1
1.99	Einleitung	1
1.100	Einleitung	1

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	2
2.1 Prostaglandinstoffwechsel	2
2.2 Prostazyklin	6
2.3 Thromboxan A ₂	10
2.4 Physiologie und Pathophysiologie der Prostazyklin- und Thromboxanbildung	12
2.5 Analytik der Prostaglandine	13
2.6 Statistik	15
3. Ziele	16
4. Material und Methoden	18
4.1 Bestimmung von Thromboxan B ₂ im Serum	18
4.2 Bestimmung von 2,3 dinor-Thromboxan B ₂ im Urin	19
4.3 Bestimmung von 2,3 dinor-6 keto-PGF _{1α} im Urin	19
5. Ergebnisse	23
5.1 Validisierung der Bestimmung von 2,3 dinor-TxB ₂	23
5.2 Validisierung der GC-MS Bestimmung von 2,3 dinor-6 keto- PGF _{1α}	23

5.3	Protokolle und Ergebnisse der Untersuchungen	25
5.3.1	Physiologische Untersuchungen	25
5.3.2	Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen	25
5.3.3	Klinische Untersuchungen	29
5.3.4	Ergebnisse der klinischen Untersuchungen	30
5.3.5	Pharmakologische Untersuchungen (Studien mit Acetylsalicylsäure, Dazmegrel und Isosorbiddinitrat)	33
5.3.6	Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen	34
6.	Diskussion	38
6.1	Methoden	38
6.2	Physiologische Untersuchungen	46
6.3	Klinische Untersuchungen	48
6.4	Pharmakologische Untersuchungen	53
7.	Zusammenfassung	60
8.	Literatur	62

Abbildungen:

- 1 Strukturformel der Arachidonsäure
- 2 Synthese der Eicosanoide
- 3 Strukturformel des Prostazyklins
- 4 Metabolismus des Prostazyklins
- 5 Strukturformel des Thromboxan A_2
- 6 Metabolismus von Thromboxan A_2
- 7 Massenspektrum von 2,3 dinor-6 keto-PGF $_{1\alpha}$
- 8 Wiederfindung von 2,3 dinor-6 keto-PGF $_{1\alpha}$
- 9 2,3 dinor-TxB $_2$ Ausscheidung bei Männern und Frauen vor und nach der Menopause
- 10 2,3 dinor-TxB $_2$ - und 2,3 dinor-6 keto-PGF $_{1\alpha}$ -Ausscheidung bei Rauchern und Nichtrauchern
- 11 2,3 dinor-TxB $_2$ - und 2,3 dinor-6 keto-PGF $_{1\alpha}$ -Ausscheidung bei Typ I Diabetikern
- 12 2,3 dinor-TxB $_2$ Ausscheidung vor, nach low dose und nach high dose ASA
- 13 2,3 dinor-TxB $_2$ Ausscheidung vor und nach Dazmegrel
- 14 2,3 dinor-TxB $_2$ Ausscheidung am ersten Studientag und nach 2-wöchiger Einnahme von Isosorbiddinitrat
- 15 TxB $_2$ -Immunoreaktivität eines HPLC-Profiles von Lipiden aus Urin
- 16 Eichkurven für TxB $_2$ und 2,3 dinor-TxB $_2$
- 17 Vergleich der Ergebnisse direkter RIA/HPLC + RIA
- 18 Abhängigkeit des Messwerts vom TxB $_2$ -Anteil
- 19 Wiederfindung im direkten RIA für 2,3 dinor-TxB $_2$

Tabellen

- 1 2,3 dinor-TxB₂-Ausscheidung an 5 verschiedenen Tagen
- 2 Vergleich der Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂,
2,3-dinor-6 keto-PGF_{1α} und 6 keto-PGF_{1α} bei Neugeborenen,
Kleinkindern und Erwachsenen
- 3 Synthesekapazität von inkubiertem Vollblut für TxB₂
vor und unter ISDN-Therapie
- 4 Untersuchung zur Rolle von TxA₂ bei der Pathogenese
der koronaren Herzerkrankung
- 5 Veränderung des Prostazyklin-Thromboxan-Systems bei
Diabetes mellitus
- 6 Auswirkungen des Rauchens auf das Prostaglandinsystem
- 7 Klinische Studien zur antithrombotischen Wirksamkeit
von ASA

Abkürzungen:

AA	Arachidonic acid = Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ASA	Acetylsalicylic acid
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
GC-MS	Gaschromatographie - Massenspektrometrie
12-HETE	12-hydroxy-eicosatetraenoic acid
HHT	12-hydroxy-heptadecatrienoic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
ISDN	Isosorbiddinitrat
NSAID	non steroidal antiinflammatory drugs
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ = Prostazyklin
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of means
TxA ₂ /TxB ₂	Thromboxan A ₂ /B ₂



1. Einleitung

Die klinische und biochemische Forschung auf dem Gebiet der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die in den Industrienationen hinsichtlich Morbidität und Mortalität eine herausragende Position einnehmen, stellt ein besonders wichtiges Gebiet der Medizin dar. Besonderes Interesse kommt dabei der Aufklärung jener Mechanismen zu, über die die bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose wie Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hypertonie, Zigarettenrauchen und andere zur Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen.

Der Beweis der Thrombozytenaktivierung durch verschiedene Prostanoidе ergab Hinweise auf eine Beteiligung der Prostanoidе am atherosklerotischen Krankheitsgeschehen. Ob Eicosanoide bei der Pathogenese der Atherosklerose und koronaren Herzerkrankung eine entscheidende Rolle spielen, ist heute Gegenstand intensiver Forschung. Im Mittelpunkt des Interesses stehen die Prostanoidе Thromboxan A_2 und Prostazyklin (Prostaglandin I_2), die auf Thrombozyten und glatte Gefäßmuskulatur einen antagonistischen Einfluß haben.

Wir konzentrierten uns auf Thromboxan A_2 , eine chemisch instabile Substanz, die Thrombozytenaggregation und Vaskonstriktion auslöst, und dessen Metabolite. Um die in vivo Produktion von Thromboxan A_2 im Gefäßsystem zu bestimmen, massen wir seinen Hauptmetaboliten im Urin, 2,3 dinor-Thromboxan B_2 .

Wir untersuchten die 2,3 dinor-Thromboxan B_2 Ausscheidung im Urin in Abhängigkeit von Alter und Zigarettenkonsum bei gesunden Probanden und bei Patienten mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen sowie den Einfluß verschiedener

Medikamente auf den Thromboxan-Stoffwechsel. Insbesondere untersuchten wir verschiedene Dosierungsschemata von Zyko-oxygenasehemmern und einen selektiven Thromboxansynthetasehemmer.

Im Hinblick auf eine mögliche Vereinfachung des Verfahrens untersuchten wir die Gesamt-Immunoreaktivität des Urins gegen einen Thromboxan-Antikörper als Ausdruck der systemischen Thromboxanbildung.

2. Stand der Forschung

2.1 Prostaglandinstoffwechsel

Prostaglandine sind eine Gruppe oxygenierter Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit 20 C-Atomen, die sich formal von der Prostansäure herleiten. Ihre Benennung erfolgt nach den funktionellen Gruppen am Zyklopentanring. Die Anzahl der Doppelbindungen wird in einem Index der Benennung nachgestellt. Im menschlichen Organismus kommen hauptsächlich Prostaglandine mit zwei Doppelbindungen vor, die aus Arachidonsäure gebildet werden. Arachidonsäure ist eine ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und 4 Doppelbindungen aus der Familie der n-6 Fettsäuren, deren erste Doppelbindung am sechsten C-Atom beginnt. Abbildung 1 zeigt die Strukturformel der Arachidonsäure.

Sie wird im menschlichen Organismus größtenteils aus Linsäure synthetisiert und nur zum kleineren Teil mit der Nahrung zugeführt. Arachidonsäure liegt im Körper nur in kleinsten Konzentrationen frei vor. Sie ist vorwiegend in Membran-Phospholipiden in 2-Stellung des Glycerinrestes

verestert. Durch verschiedene Stimuli wie Thrombin, Kollagen, plättchenaktivierenden Faktor, ADP, Arachidonsäure und andere wird auf erst teilweise geklärte Weise Phospholipase C aktiviert, die ihrerseits über eine Erhöhung des zytosolischen Ca^{++} die Phospholipase A_2 aktiviert. (54,55) Durch das Enzym Phospholipase A_2 wird Arachidonsäure aus den Membran-Phospholipiden der Zelle freigesetzt, und kaskadenförmig durch Zykllooxygenase bzw. Lipxygenasen in eine Vielzahl von Produkten überführt. (54) Durch die Zykllooxygenase wird das Endoperoxid PGG_2 gebildet, das durch eine Peroxidase zum Endoperoxid PGH_2 umgesetzt wird. (37a) Aus den beiden Endoperoxiden synthetisieren Isomerasen bzw. Reduktasen und spezifische Synthetasen die für das jeweilige Gewebe typischen Prostanoiden. (113) Abbildung 2 zeigt die Synthese der Eicosanoide aus Arachidonsäure.

Der Abbau der Prostaglandine D_2 , E_2 und $\text{F}_{2\alpha}$ erfolgt vorwiegend in der Lunge. Dabei entstehen durch Oxidation der OH-Gruppe am C-Atom 15 und durch Reduktion der 13-14 Doppelbindung inaktive Metabolite. Es folgen Schritte der β -Oxidation und auch w-Oxidation.

Die Metaboliten von Prostazyklin und Thromboxan A_2 sind 2,3-dinor-6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ bzw. 2,3dinor- TxB_2 . Letzteres stellt etwa 25 % der ex vivo nachweisbaren Metaboliten von TxA_2 .

Abbildung 2 zeigt den Syntheseweg der Eicosanoide aus Arachidonsäure.

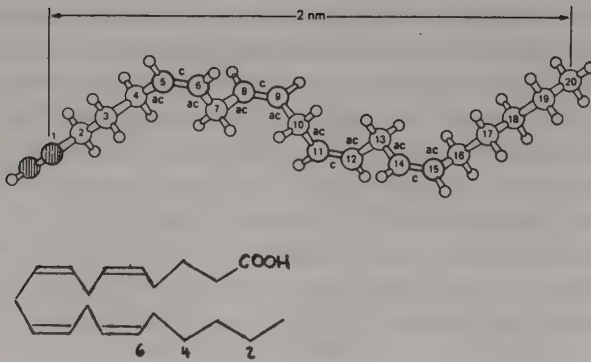
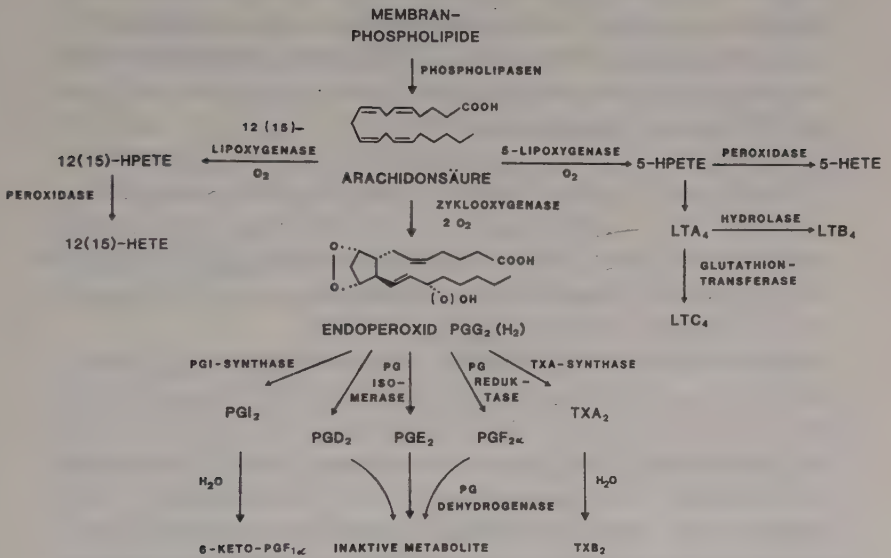


Abbildung 1: Strukturformel der Arachidonsäure

Abbildung 2: Biosynthese der Eicosanoide (Arachidonsäure-kaskade)



2.2 Prostazyklin

Prostazyklin (PGI_2) wurde 1976 von Moncada und Vane entdeckt, die in einem Bioassay eine Endoperoxidumsetzung in Gefäßendothelien feststellten, ohne das bereits bekannte Endoperoxidprodukt Thromboxan A_2 nachweisen zu können. (67) Es entstand im Gegenteil eine antiaggregatorische Substanz. Die Struktur wurde noch im selben Jahr aufgeklärt und ist in Abbildung 3 dargestellt. (47)

In den darauffolgenden Jahren wurde die Synthese von PGI_2 im Magen (78), in Arterien (67), in der Lunge (41), in der Niere und in vielen anderen Geweben nachgewiesen. PGI_2 wird vorwiegend von Endothelzellen sowohl aus Arachidonsäure als auch aus Endoperoxiden hergestellt. (70)

Folgende biologische Wirkungen des Prostazyklins sind bekannt:

Antiaggregation: PGI_2 ist der stärkste bekannte biologische Hemmstoff für die Aggregation von Thrombozyten. (65) PGI_2 und PGE_1 binden an einen spezifischen Rezeptor der Thrombozyten-Oberflächenmembran, worauf durch Stimulation der Adenylzyklase die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht werden. (65, 106a) Durch Erhöhung des cAMP wird auf noch ungeklärte Weise die Hydrolyse der Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden durch Phospholipase C gehemmt und dadurch der Ablauf der Folgereaktionen Ca^{++} -Mobilisation, Phospholipase A_2 -Aktivierung, Arachidonsäurefreisetzung und Thromboxansynthese verhindert.

Prostazyklin ist auch in der Lage, primäre Thromben aufzulösen. (67)

Da für die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation geringere Konzentrationen erforderlich sind als für die Hemmung der Adhäsion der Thrombozyten am Subendothel, ist es möglich, daß eine Anheftung der Thrombozyten am Subendothel erfolgt, während die Aggregation gehemmt ist. (65) Dies ist für Reparaturvorgänge nach einer Endothelverletzung von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise wird durch eine Endoperoxid-Übertragung von den adhätierenden Thrombozyten zum intakten Endothel die lokale Prostazyklinproduktion erhöht (69a) und so die Thrombozytenadhäsion auf die Fläche des Endotheldefekts begrenzt. (8)

Vasodilatation: Durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird eine starke Vasodilatation bewirkt. (69)

An der Niere bewirkt Prostazyklin eine Erhöhung der Renin-Ausschüttung. (118, 81) Über einen hämodynamischen und einen tubulären Angriffspunkt wirkt es als lokaler Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. (81, 111, 113)

PGI_2 hydrolysiert bei physiologischem pH mit einer Halbwertszeit von 3 min. (18) Die Reaktion ist nicht enzymatisch katalysiert. (106, 47) Das Produkt, 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ist biologisch nahezu unwirksam. Der weitere Abbau erfolgt enzymatisch, wobei fast immer ein β -Oxidationsschritt vorkommt. (91, 92) Als Hauptmetabolit im menschlichen Urin wurde* 2,3 dinor-6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ festgestellt. (90) Abbildung 4 zeigt den Metabolismus von Prostazyklin.

* mit ca. 20,5 %

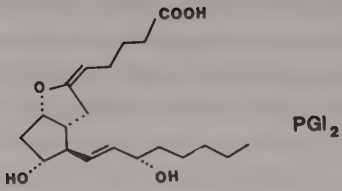
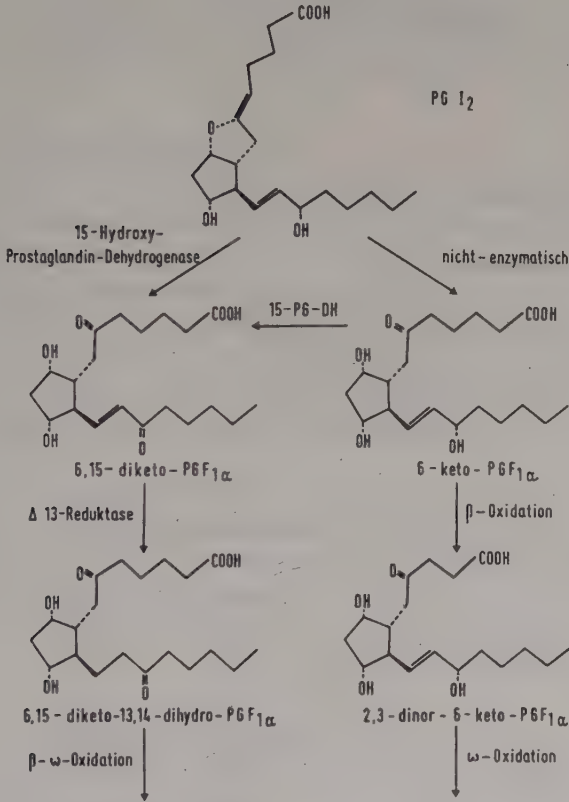


Abbildung 3: Strukturformel des Prostazyklins

Abbildung 4: Metabolismus des Prostazyklins



2.3 Thromboxan A₂

1975 klärten Hamberg, Svensson und Samuelsson die Struktur eines Teils der seit 1969 bekannten "rabbit aorta contracting substance" und benannten die Substanz Thromboxan A₂ (TxA₂). (37, 84) Abbildung 5 zeigt die Strukturformel des TxA₂.

Thromboxan A₂ wird vornehmlich in Thrombozyten durch die Thromboxan-Synthetase aus den Endoperoxiden PGG₂ und PGH₂ gebildet. (74) Thromboxan A₂ wirkt über einen Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, der mit dem PGH₂-Rezeptor identisch ist. (45, 7) Nach Ablauf der Thrombozytenaktivierungsreaktion mit der Kaskade von Rezeptorerregung, cAMP-Erniedrigung, Phospholipase C-Aktivierung, Ca⁺⁺-Mobilisierung, Phospholipase A₂-Aktivierung und damit Freisetzung von Arachidonsäure bilden die Thrombozyten Thromboxan A₂ und setzen es frei.

Thromboxan A₂ ist von allen biologischen Substanzen die am stärksten vasokonstriktorisch wirksame. Es aktiviert die Aggregation von Thrombozyten. Möglicherweise dient es dazu, am Ort einer Gefäßschädigung durch lokale Hämostase den Verschuß des Defekts zu fördern. (73)

Nach Freisetzung in den Extrazellulärraum wird es mit einer Halbwertszeit von etwa 30 sec nichtenzymatisch zu Thromboxan B₂ hydrolysiert. (37) TxB₂ wird auf verschiedenen Wegen metabolisiert, wobei als wichtigster von etwa 20 Metaboliten* 2,3 dinor-TxB₂ im Urin ausgeschieden wird. (86, 87) Abbildung 6 zeigt die Hydrolyse des TxA₂.

* mit ca. 23 %

Abbildung 5: Strukturformel des Thromboxan A₂

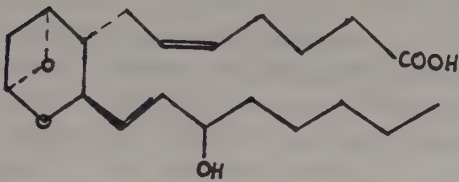
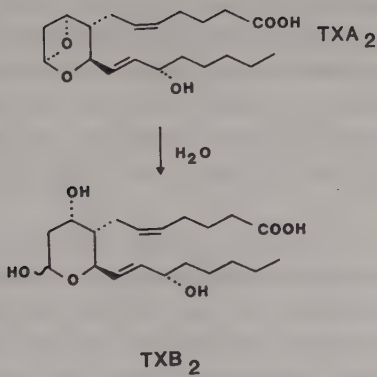


Abbildung 6: Metabolismus von Thromboxan A₂



2.4 Physiologie und Pathophysiologie der Prostazyklin- und Thromboxanbildung

Durch ihren Angriff auf Gefäßmuskulatur und Thrombozyten ziehen Veränderungen des Prostazyklin-Thromboxan-Systems zwei Hauptwirkungen nach sich: Modulation von Blutdruck und Organdurchblutung sowie der Thrombozytenaggregation.

Hämodynamik: Durch eine Beeinflussung der glatten Gefäßmuskulaturzellen wirkt das $\text{PGI}_2/\text{TxA}_2$ -System sowohl auf den systemischen Blutdruck als auch auf die Durchblutung einzelner Organe.

Niere: Renal gebildete Prostanoiden stellen einen Regulationsmechanismus für den renalen Blutstrom und das Glomerulumfiltrat dar. So kommt die rapide Zunahme des renalen Blutstroms nach der Geburt möglicherweise durch eine Veränderung der Prostanoidsynthese zustande. (47a) Auf bestimmte Reize wie Kaliumverlust, Natriumverlust, Hypotension oder renale Ischämie wird durch eine erhöhte Prostanoidsynthese die Empfindlichkeit der renalen Gefäße für Angiotensin II verändert. (111) Dadurch wird die Wirkung des Renin/Angiotensin-Systems lokal moduliert. (81)

Lunge: Bei der Umstellung des kindlichen Kreislaufs nach der Geburt spielen Prostanoiden sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Insbesondere bei der Öffnung der Lungenstrombahn und beim Verschluß des Ductus arteriosus Botalli wird eine Steuerung über vasodilatierende bzw. -konstringierende Prostanoiden in Betracht gezogen. Diese Überlegung mündete in den therapeutischen Ansatz, bei persistierendem Ductus arteriosus einen Verschluß durch die Gabe von Zyklooxygenasehemmern zu induzieren. (72)

Thrombozytenaggregation: Prostazyklin ist in der Lage, die Aggregation von Thrombozyten wirksam zu hemmen und in höheren Konzentrationen sogar Thrombozytenaggregate wieder aufzulösen.

Thromboxan A_2 könnte ein fördernder Faktor für die Entstehung der Arteriosklerose sein. Der Effekt ist möglicherweise ausgelöst durch die postkonstriktorische Hypoxie am Endothel und durch die Wirkung des PDGF (platelet derived growth factor) auf die Gefäßmuskelzellen. Dieser Faktor ist eine Ursache für die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, die ein frühes Stadium der Arteriosklerose darstellt.

Bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer Gefäßschädigung einhergehen, lassen sich Störungen des Prostanoidstoffwechsels nachweisen. Bei Individuen mit Diabetes mellitus wurde in verschiedenen Untersuchungen eine Erniedrigung der PGI_2 -Produktion oder eine Erhöhung der TxA_2 -Produktion nachgewiesen. (17, 40) Die thrombozytopenische Purpura könnte durch eine beschleunigte Inaktivierung des Prostazyklins verursacht sein, was einen höheren Thrombozytenverbrauch nach sich zieht. (11)

2.5 Analytik der Prostaglandine

Während zu Beginn der Prostaglandinforschung noch die meisten Erkenntnisse auf den Ergebnissen von Bioassays beruhten, setzten sich in den letzten Jahren die sensitiveren und spezifischeren Verfahren RIA und GC-MS durch.

Bioassay: Die Messung der Prostanoidkonzentration erfolgt durch die Bestimmung der Reaktion von isolierten prostaglandinempfindlichen Geweben, die mit der Probe benetzt oder perfundiert werden. Diese Reaktion ist meist eine konzentrationsabhängige Kontraktion oder Relaxation. Die Spezifität der Methode ist von den PG-Rezeptoren der verwendeten Gewebestreifen abhängig. Die Nachteile der Methode sind geringe Spezifität und Genauigkeit, sowie ein geringer Probendurchsatz. Der Vorteil ist die Möglichkeit der Bestimmung biologischer Aktivitäten auch unbekannter Substanzen, was nicht zuletzt zur Entdeckung der Prostaglandine geführt hat. (84)

Radioimmunoassay (RIA): Die Messung erfolgt durch eine kompetitive Bindung von radioaktiv markierten und den zu bestimmenden Prostaglandinen an Antikörpern. Die Spezifität der Methode hängt von der Spezifität der Antikörper ab. Der RIA ist meist empfindlicher und spezifischer als der Bioassay, jedoch ist oft eine aufwendige Reinigung der Probe erforderlich, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Von den anfänglichen RIA-Messungen waren viele Ergebnisse nicht mit GC-MS zu verifizieren, weil sie falsch hohe Werte lieferten. (99) Die Ergebnisse des RIAs müssen durch Recovery-Versuche verifiziert werden, in denen Messungen vor und nach Reinigung der Proben übereinstimmende Ergebnisse bringen sollten.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS): Dies ist im Moment die aufwendigste, aber auch spezifischste und genaueste Methode zur Messung von Prostanoiden. Nach Zugabe eines deuterierten Prostanoids als internem Standard wird das gesuchte Prostanoid aus der Probe extrahiert, gereinigt und nach Derivatisierung mittels GC-MS gemessen. Durch das aufwendige Extraktions- und Reinigungsverfahren, die Auftrennung mit GC und die Bestimmung charakteristischer Fragmente

im MS wird die selektive Messung einzelner Prostanoiden ermöglicht.

Durch die anfänglich übliche Messung von Prostazyklin im Bioassay entstand der Eindruck, PGI_2 sei ein zirkulierendes Hormon. (68) Diese Annahme entstand durch die Beobachtung einer relativ langen Halbwertszeit, der fehlenden Elimination im Lungenkreislauf und der Stabilisierung durch verschiedene Serumproteine. (41, 18, 77, 4) Diese Hypothese mußte aufgegeben werden, als aufwendigere Messungen ergaben, daß die Plasmaspiegel um 2-3 Zehnerpotenzen unter den ex vivo antiaggregatorisch wirksamen Konzentrationen liegen. (3, 25, 99) Die Messung von Plasmaspiegeln von PGI_2 , TxA_2 , 6-keto-PGF_{1 α} und TxB_2 wurde in den letzten Jahren zunehmend aufgegeben, weil die gewonnenen Werte durch Endothel- und Thrombozytenaktivierung während der Probengewinnung verfälscht werden können. (30)

2.6 Statistik

Die gewonnenen Daten wurden innerhalb von Stichproben als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittel (standard error of means) angegeben. Vergleiche zwischen verschiedenen Stichproben wurden nach dem Student's t-Test für verbundene und unverbundene Meßwerte untersucht (student's t-test for paired and unpaired samples). Das Signifikanzniveau ist als Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Nullhypothese als p angegeben.

3. Ziele

Prostazyklin und Thromboxan lassen sich nicht direkt ex vivo bestimmen, weil die zirkulierenden Mengen sehr klein und beide Stoffe instabil sind. Die Messung der nichtenzymatisch gebildeten Abbauprodukte Thromboxan B_2 und 6 keto-PGF $_{1\alpha}$ aus Serum wird durch die Aktivierung der Prostanoidsynthese während der Probengewinnung verfälscht. Die Bestimmung von TxB_2 aus inkubiertem Vollblut erlaubt lediglich eine Aussage über die Synthesekapazität des Systems.

Die Bestimmung von enzymatisch gebildeten Metaboliten aus dem Urin erlaubt eine Messung der gesamten systemischen Prostazyklin- und Thromboxanproduktion während einer Urin-Sammelperiode. Hierbei ist oft keine Aussage über den Ursprung der gemessenen Metabolite möglich, da beide Prostanoiden im gesamten Gefäßsystem gebildet werden. Lediglich der Anteil renalen Ursprungs kann differenziert werden, da die dort gebildeten Prostanoiden vorwiegend in Form ihrer nichtenzymatisch entstandenen Metabolite ausgeschieden werden.

Wir versuchten, die systemische Thromboxanbildung in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht zu bestimmen. Wir untersuchten den Einfluß von Acetylsalicylsäure in verschiedenen Dosierungen sowie eines selektiven Thromboxan-Synthetase-Hemmers auf die 2,3 dinor- TxB_2 Ausscheidung. Darüberhinaus beschäftigten wir uns mit Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose. In diesem Zusammenhang bestimmten wir den Einfluß des Zigarettenrauchens auf die systemische Thromboxanproduktion. Außerdem versuchten wir festzustellen, ob die diabetische Angiopathie in Zusammenhang steht mit einer Veränderung der Prostanoidproduktion im Gefäßsystem. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

versuchten wir festzustellen, ob sich die Erkrankung in der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung widerspiegelt und ob eine Therapie mit Nitraten Auswirkungen auf die Thromboxansynthese hat.

Darüberhinaus versuchten wir, unsere Methode zur Messung von 2,3 dinor-TxB₂ dahingehend zu adaptieren, daß sie als Screening-Methode für große Probenzahlen tauglich wird und bewerteten die Aussagekraft der mit der vereinfachten Methode gewonnenen Werte.

4. Material und Methoden

4.1 Bestimmung von Thromboxan B_2 im Serum

Die Bestimmung von Thromboxan B_2 im Serum dient zur Feststellung der maximalen Syntheseleistung der Thrombozyten für Thromboxan A_2 vor allem im Rahmen von pharmakologischen Untersuchungen.

Zur radioimmunologischen Bestimmung von TxB_2 im Serum entnehmen wir Blut mit einer Butterfly-Kanüle aus einer Ellenbeugenvene und liessen es in entfetteten Glasröhrchen bei $37^\circ C$ im Wasserbad gerinnen. (80) Nach 1 h wurde die Inkubation durch Abzentrifugieren der korpuskulären Bestandteile des Blutes beendet. ($4^\circ C$; 15 min; 3000 Upm)

Zur Durchführung des Radioimmunoassays pipettiert man 25 μl einer Verdünnung des Serums ein, die je nach erwarteter TxB_2 -Konzentration im Verhältnis von 1:10 bis 1:500 angesetzt wurde. Der Antikörper wird in einer Endverdünnung von 1:190 000 zugesetzt. (24) Das radioaktive $^3H\text{-}TxB_2$ (NEN) wird je nach seiner Aktivität in einer Menge zugesetzt, die in der sog. "total"-Probe 1000-1500 cpm ergab. Diese Probe wurde nicht mit Aktivkohle behandelt, so daß das gesamte $^3H\text{-}TxB_2$ in Lösung blieb. Außerdem gaben wir 100 μl eines NaCl/y-Globulin-Puffers (NaCl = 9mg/ml; y-Glob. = 2 mg/ml; Boratpuffer = 0,05 M pH = 7,4) zu. Die Proben wurden über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Durch Zugabe von 500 μl einer Suspension von Aktivkohle entfernt man das freie $^3H\text{-}TxB_2$ und TxB_2 . (1,25 g Kohle; 0,125 g Dextran 70; 0,275 g K_2HPO_4 ; 0,055 g NaH_2PO_4 ; Aqua dest. ad 200 ml) Ein Aliquot von 500 μl des Überstandes wird mit 4 ml Aqualuma gemischt und zur Aktivitätsbestimmung in den β -Zähler verbracht.

4.2 Bestimmung von 2,3 dinor-Thromboxan B_2 im Urin

Wir bestimmten im Urin ausgeschiedenes 2,3 dinor- TxB_2 mit einem Radioimmunoassay nach Reinigung der Thromboxanmetabolite über HPLC. (23, 99, 101)

Von den Urinproben wurden 30 ml Aliquots bei pH 3,5 mit Sep-Pak C18 Kartuschen extrahiert und mit Ethylacetat eluiert. Die Trennung von TxB_2 und 2,3 dinor- TxB_2 erfolgte über reverse-phase HPLC mit Wasser/Acetonitril/Essigsäure im Verhältnis 760/240/2 als Fließmittel. Der Durchfluß betrug 2 ml/min. Der 2,3 dinor- TxB_2 -Peak wurde durch Screening von Aliquots der Minutenfraktion gefunden. Die Retentionszeit des Peaks wurde mit der Retentionszeit von eingesetztem 2,3 dinor- TxB_2 verglichen. Zur Durchführung des RIAs poolten wir die HPLC-Fraktionen, die den 2,3 dinor- TxB_2 -Peak umfassten. Der verwendete Antikörper hat mit 2,3 dinor- TxB_2 eine Kreuzreaktivität von 48 %. Die übrigen Kreuzreaktionen mit 6 keto- $PGF_{1\alpha}$, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, HHT, 12-HETE und PGD_2 waren kleiner als 0,5 %. Das weitere Verfahren ist mit dem oben beschriebenen RIA zur Bestimmung von TxB_2 im Serum identisch.

4.3 Bestimmung von 2,3 dinor-6 keto- $PGF_{1\alpha}$ im Urin

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte für 2,3 dinor-6 keto- $PGF_{1\alpha}$ wurden mit in dem Labor etablierten und publizierten Methoden (20, 22, 23) erhalten. Die Methode beruht auf der Messung mittels kombinierter Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach Extraktion über C-18 Kartuschen, Extraktion des Lactons und Bildung des Methyl-, Methoxim-, Trimethylsilylderivates.

Extraktion: Zu einem 20 ml Aliquot von 24h-Urin gaben wir nach Abzentrifugieren des Sediments 25 ng D_4 -2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} als internen Standard. Der pH-Wert wird mit 2 N NaOH auf 10-11 eingestellt und die Probe bei Raumtemperatur 15' stehengelassen. Danach wird die Probe auf pH 3,1-3,4 angesäuert und durch eine mit 20 ml Ethanol aktivierte und mit 20 ml Wasser gespülte SEP-Pak C 18 Kartusche gedrückt. Die Kartusche wird mit 20 ml Ethylacetat eluiert und das Eluat im Scheidetrichter 3x mit 0,05 M $Na_2B_4O_7$ -Puffer (pH = 8) gewaschen. Danach wird die EtAc-Phase in Spitzkolben überführt und das Lösungsmittel abrotiert. Nach Überführen des Rückstandes in Spitzgläser und Trocknen mit N_2 werden 50 μ l Pyridin wasserfrei zugegeben. Wir gaben 1 ml Boratpuffer (s.o.) dazu und schüttelten 3 x mit 10 ml EtAc durch (org. Phase verwerfen!). Nach Ansäuern auf pH 2-3 mit 1 N HCl wird mit 4 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die wässrige Phase wird verworfen und die Dichlormethanphase mit 1 ml H_2O nachgewaschen. Die organische Phase wird in spitze Schliffröhrchen überführt und unter N_2 getrocknet.

Derivatisierung für GC-MS: Die Probe wird in 50 μ l eines Gemisches von Pyridin/Wasser/Triäthylamin (10:10:1) gelöst und nach 1 h bei Raumtemperatur im N_2 -Strom getrocknet. Der Rückstand wird mit 100 μ l Methoxyamin-HCl versetzt und nach 1 h bei 70 °C unter N_2 getrocknet. Zum in Methanol gelösten Rückstand gibt man tropfenweise CH_2N_2 in Äther bis die Lösung ihre gelbe Farbe behält. Nach Trocknen unter N_2 gibt man 50 μ l BSTFA (bis-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid) zu und läßt die Probe 1 h stehen. Wir bliesen das Lösungsmittel mit N_2 ab und bewahrten die Proben bis zur Messung bei -20 °C in Ethylacetat auf.

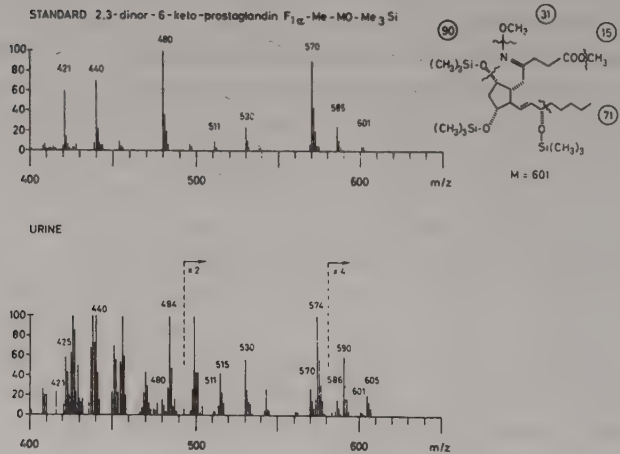
GC-MS: Das GC-MS-Gerät trennt in einer Kapillare die eingebrachten Substanzen im Gasstrom nach Retentionszeiten (GC) und zeichnet die relative Intensität bestimmter Fragmente

bekannter Masse auf (MS). So läßt sich durch Vergleich der Retentionszeiten und der Masseneinheiten eine sichere Zuordnung der Messergebnisse zu bestimmten Substanzen machen. Unser Gerät ist ein Finnigan MAT 44. Es ist ausgestattet mit einer Silica-Kapillare mit 25 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser. Das Gerät wurde auf folgende Werte eingestellt: Injection port Temperatur 280 °C; Interface 270 °C; Ionenquelle 200 °C; Elektronenenergie 80 eV; Emissionsstrom 0,9 mA; Spannung am Elektronenverstärker 2,3 kV; He-Fluss in der Kapillare 2 ml/min.

Die Abbildung 7 zeigt ein Massenspektrum eines Urinextraktes und einer Standardsubstanz. (22)

Abbildung 7: Massenspektrum von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} sowie einer Urinprobe mit deuterierter Standardsubstanz und isolierten endogenen Substanzen.

Strukturformel von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} mit Fragmentierungsmuster



5. Ergebnisse

5.1 Validisierung der Bestimmung von 2,3 dinor-TxB₂ und TxB₂

Der Radioimmunoassay mit TxB₂-Antikörper und ³H-TxB₂ als Tracer hat eine untere Nachweisgrenze von 0,8 +/- 0,15 pg. Eine 50 %ige Bindung am Antikörper wurde bei 9 +/- 1 pg (n = 21) erzielt. Die Gesamt-Recovery lag bei 42 %.

Die Variabilität der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung ist in Tabelle 1 für vier Probanden an fünf verschiedenen Tagen aufgeführt.

Tabelle 1: 2,3 dinor-Thromboxan-B₂-Ausscheidung in ng/g Kreatinin

Proband	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1	749	249	606	468	387
2	433	522	478	608	527
3	682	198	613	346	238
4	439	634	668	611	441

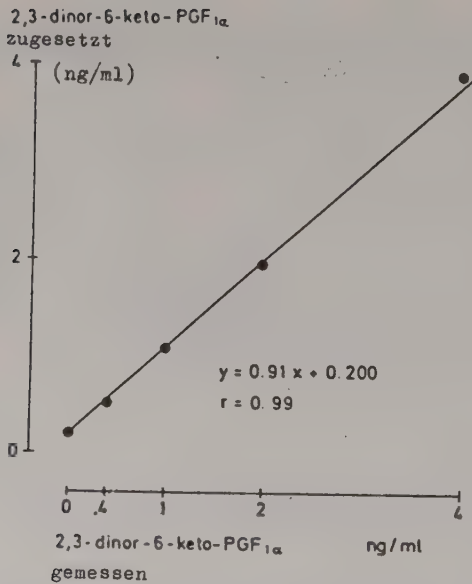
5.2 Validisierung der GC-MS Bestimmungen von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}

Zur Validisierung der GC-MS Methode versuchten wir, einem Urin in physiologischen Mengen zugesetztes 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} mit GC-MS wiederzufinden. Im physiologischen Bereich fanden wir die zugesetzte Menge 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} zu 91 % wieder (Recovery). Dabei betrug der Korrelationskoeffi-

zient $r = 0.99$.

Abbildung 8 zeigt die Wiederfindung von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} in Urin mit GC-MS.

Abbildung 8: Wiederfindung von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} , das Urin in physiologischen Mengen zugesetzt wurde, nach Extraktion, Reinigung, Derivatisierung und Messung mittels GC-MS



5.3 Protokolle und Ergebnisse der Untersuchungen

5.3.1 Physiologische Untersuchungen

Wir versuchten die Frage zu beantworten, ob die in den ersten Lebenstagen ablaufenden Veränderungen im Kreislaufsystem wie die Zunahme der renalen Durchblutung oder die Abnahme des pulmonalen Widerstands, sich in der Prostanoidausscheidung niederschlagen.

Neugeborene: Zur Untersuchung von Neugeborenen-Urin sammelten wir nach Information und Zustimmung der Mütter Urine von gesunden Neugeborenen mithilfe aufgeklebter Urinbeutel und poolten die Urine, um 5 Proben à 25 ml zu bekommen. Von gesunden 3-jährigen Kindern sammelten wir 24 h-Urine und untersuchten 50 ml Aliquots. Diese Proben wurden im Rahmen einer früheren Arbeit erhalten. (17a, 48a)

Erwachsene: Wir sammelten 24 h-Urinproben von gesunden Erwachsenen, die mindestens 7 Tage vor der Sammelperiode keine Medikamente eingenommen hatten. Wir untersuchten 20 nicht-rauchende Männer zwischen 20 und 30 Jahren, 19 Frauen in reproduktionsfähigem Alter (26,3 +/- 9,1 Jahre) sowie 8 Frauen in der Postmenopause (63,2 +/- 4,4 Jahre).

Alle Urinproben wurden bei -20 °C aufbewahrt und schnellstmöglich verarbeitet.

5.3.2 Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen

Neugeborene und Kleinkinder: Die 2,3 dinor-TxB₂-Ausscheidung fiel von 6328 +/- 1210 ng/g Kreatinin am 3. Lebenstag über 3119 +/- 1080 ng/g Kreatinin (SEM; n = 5) am 5. Lebenstag auf 415 +/- 67 ng/g (SEM) Kreatinin im 3. Lebensjahr. Dabei

war das Verhältnis $\text{TxB}_2/2,3$ dinor- TxB_2 $1/5$ ggü. maximal $1/12$ bei Erwachsenen. (21)

Die Ausscheidung von $2,3$ dinor- 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ war am 3. Lebenstag $0,28 \pm 0,074$ ng/ml ggü. einem Mittelwert von $0,27 \pm 0,086$ ng/ml (SEM) bei Erwachsenen ($n = 7$). Der metabolische Vorläufer des $2,3$ dinor- 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, das 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ wurde von Neugeborenen (3. Tag) in einer Konzentration von $1,41 \pm 0,18$ ng/ml ($n = 5$; SEM) ggü. $0,11 \pm 0,015$ ng/ml bei Erwachsenen ($n = 12$; SEM) ausgeschieden. Tabelle w zeigt die Werte in Gegenüberstellung.

Tabelle 2: Vergleich der Ausscheidung von $2,3$ dinor- TxB_2 , $2,3$ dinor- 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ und 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ bei Neugeborenen, Kleinkindern und Erwachsenen

	3.Lebenstag	5.Lebenstag	3.Lebensjahr	Erwachsene (NR)
$2,3$ dinor- TxB_2 ng/g Kreatinin	6328	3119	415	351
$2,3$ dinor- 6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ng/ml Urin	0,28	-	-	0,27
6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ng/ml Urin	1,41	0,51	-	0,20

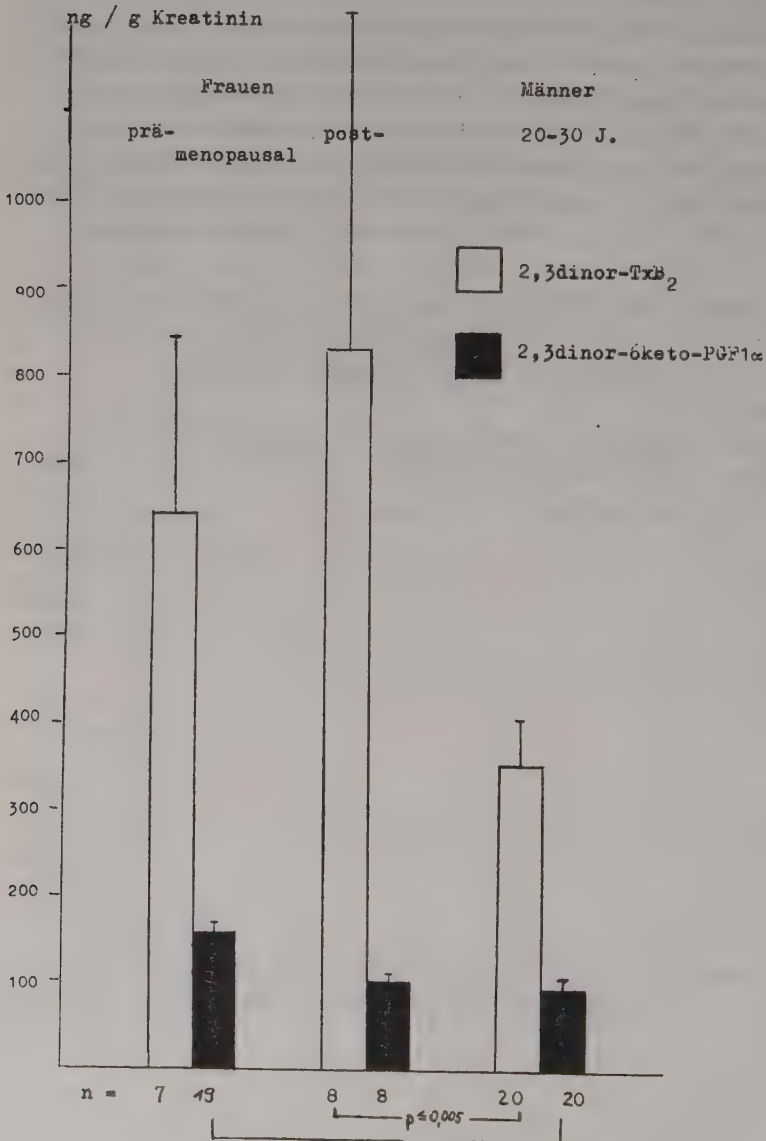
Da das Risiko vor allem von Frauen für eine thromboembolische Erkrankung mit dem Alter zunimmt, versuchten wir eine

Geschlechts- und Altersabhängigkeit der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung als Ausdruck einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung nachzuweisen.

Erwachsene: Junge nichtrauchende Männer im Alter von 20 -30 Jahren hatten eine mittlere 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung von 351,1 +/- 41 ng/g Kreatinin (n = 20; SEM) und eine 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung von 90 +/- 6 ng/g Kreatinin (n = 20; SEM). Bei Frauen im gebärfähigen Alter beträgt die 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung 640,0 +/- 210,7 ng/g Kreatinin (n = 7; SEM). Die 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung beträgt 155 +/- 4,43 ng/g Kreatinin (n = 19; SEM). Frauen in der Postmenopause hatten eine 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung von 830 +/- 377,6 ng/g Kreatinin und eine 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung von 97 +/- 9,1 ng/g Kreatinin (n = 8; SEM, p = 0,005).

Abbildung 9 zeigt die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} bei Männern, jungen Frauen und Frauen in der Postmenopause.

Abbildung 9: Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} bei prä- und postmenopausalen Frauen und bei jungen, nichtrauchenden Männern



5.3.3 Klinische Untersuchungen

Rauchen stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Als Wirkungsmechanismus wird eine Aktivierung von Thrombozyten diskutiert. Wir versuchten, anhand des renal ausgeschiedenen 2,3 dinor-TxB₂ eine gesteigerte Thrombozytenaktivität bei Rauchern festzustellen.

Raucher: Die Gruppe der Raucher bestand aus 18 jungen Männern zwischen 20 und 30 Jahren mit einem Zigarettenkonsum von 6 - 20 Zigaretten/Tag. Probanden mit akuten oder chronischen Erkrankungen wurden nicht herangezogen. Medikamenteneinnahme in den letzten 7 Tagen vor Beginn der Urinsammelperiode wurde ausgeschlossen. Wir sammelten 24-h-Urine. Patienten mit koronarer Herzerkrankung: Von 11 männlichen Patienten im Alter von 57 +/- 12,6 Jahren aus dem Krankengut der Klinik sammelten wir eine 24-h-Urinprobe sowie eine Blutprobe. Die Patienten standen unter einer Standardtherapie bei koronarer Herzerkrankung, die bei 8 Patienten Nitra-
te, bei 4 Patienten Digitalis, bei 5 Patienten β -Blocker, bei 6 Patienten Ca-Antagonisten und bei allen Patienten weitere Medikamente, darunter vor allem Antihypertensiva umfaßte.

Patienten mit diabetischer Neuropathie: Wir untersuchten 24-h-Urine von 24 Typ I Diabetikern im Alter von 44 +/- 16 Jahren mit gesicherter Neuropathie, davon 11 Männer und 13 Frauen.

5.3.4 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Raucher: Raucher hatten eine mittlere 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung von 608,9 +/- 61 ng/g Kreatinin (n = 18; SEM). Die Ausscheidung von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} betrug 117 +/- 6 ng/g Kreatinin (SEM). Abbildung 10 zeigt die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}.

Patienten mit koronarer Herzerkrankung: Die Patienten unter Standardtherapie hatten eine 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung von 640 +/- 253,1 ng/g Kreatinin (n = 9; SEM) und eine 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung von 88,7 +/- 22,6 ng/g Kreatinin (n = 9; SEM; nicht signifikant).

Patienten mit diabetischer Neuropathie: Wir fanden eine 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung von 1399 +/- 226,4 ng/g Kreatinin und eine 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung von 136 +/- 15,2 ng/g Kreatinin (n = 24; SEM).

Abbildung 11 zeigt die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} bei Typ I Diabetikern und Normalpersonen.

Abbildung 10: 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}
Ausscheidung bei Rauchern und Nichtrauchern

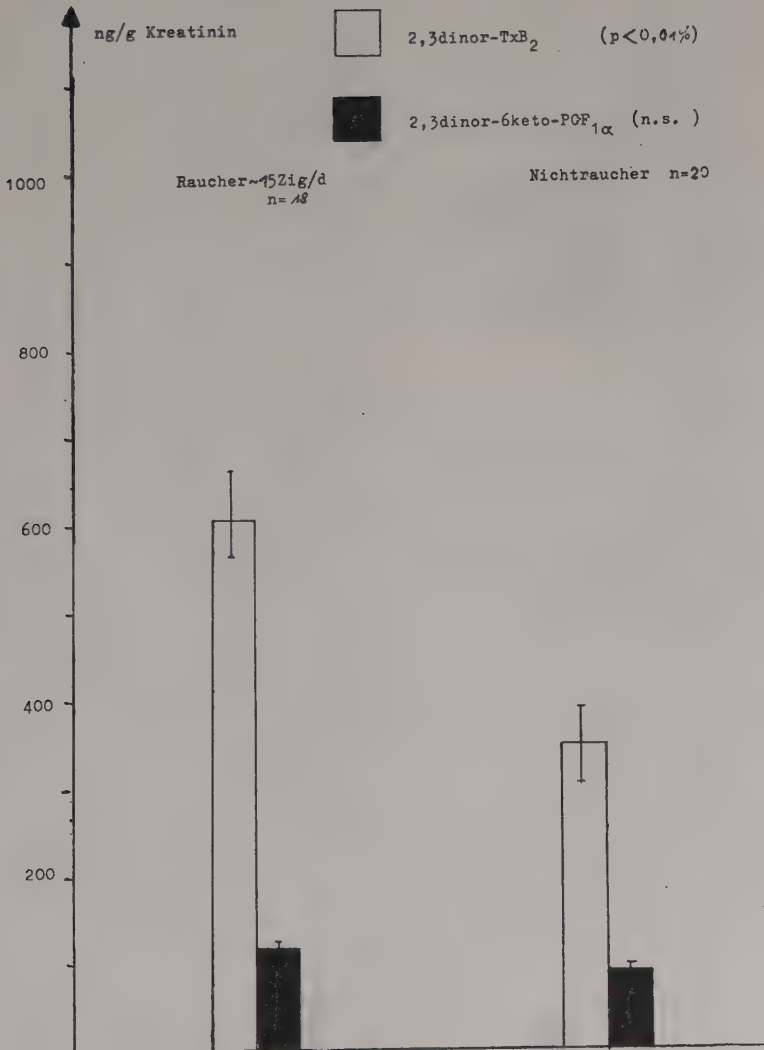
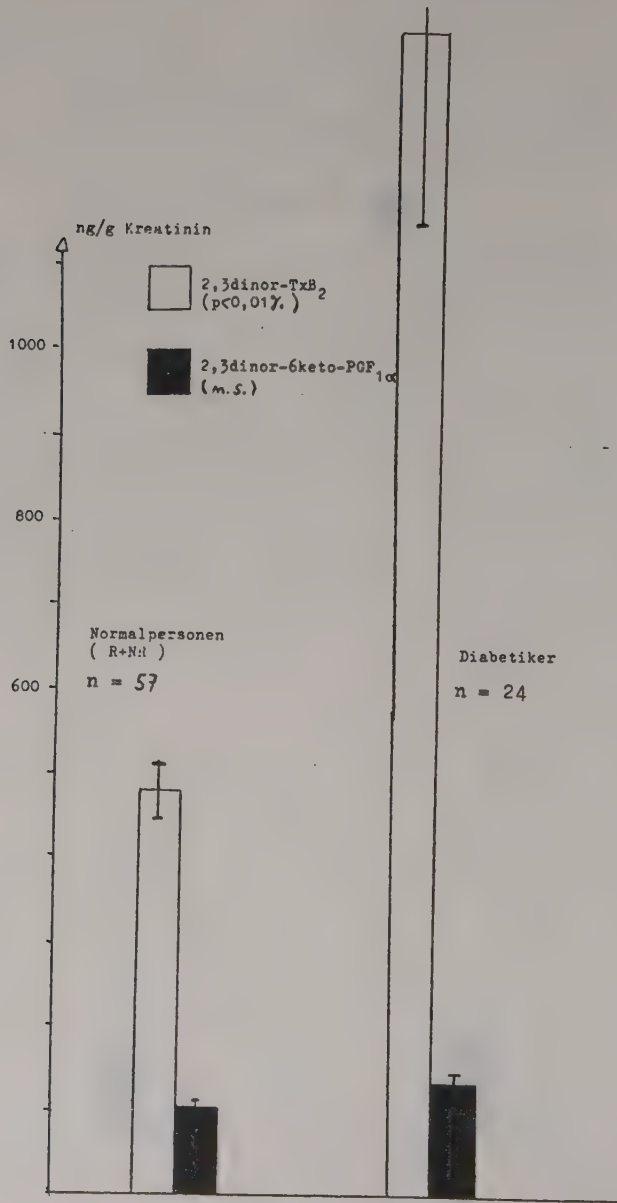


Abbildung 11: 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}
Ausscheidung bei Typ I Diabetikern



5.3.5 Pharmakologische Untersuchungen

Studien mit Acetylsalicylsäure, Dazmegrel und Isosorbiddinitrat

Acetylsalicylsäure: Wir nahmen in die Studie 7 männliche, gesunde Probanden im Alter von 26 +/- 4 Jahren auf. Die Probanden hatten in den letzten 2 Wochen vor Studienbeginn keine Medikamente eingenommen. Wir verabreichten 100 mg Acetylsalicylsäure (ASA) jeden 2. Tag über 5 Tage (low dose) und im Abstand von mindestens 2 Wochen davon an einem Tag 2 x 500 mg ASA (high dose). Die Einnahme anderer Medikamente war während der Studie verboten. Wir sammelten 24-h-Urinproben jeweils 1 h nach der morgendlichen Tabletteneinnahme beginnend sowie einen 24-h-Urin vor Beginn der Medikamenteneinnahme.

Dazmegrel: Wir führten eine Studie mit einer Dosierung von 3 x 200 mg/d mit 18 Probanden über 14 Tage durch. Die Auswahl der Probanden erfolgte wie in der ASA-Studie. Das Durchschnittsalter betrug 24 +/- 4 Jahre. Die Studie war Placebo-kontrolliert. Wir sammelten 24-h-Urine an den Tagen -1, 1, 7 und 14. An allen Tagen wurden Blutproben zur Bestimmung des Serum-TxB₂ 2 h nach Tabletteneinnahme entnommen. An den Tagen 7 und 14 erstellten wir ein Tagesprofil der Thromboxansynthesekapazität im Serum.

Isosorbiddinitrat: Wir verabreichten 16 Patienten der Klinik mit koronarer Herzerkrankung Isosorbiddinitrat (ISDN) oral in den Dosierungen 80-0-0 oder 80-0-80 mg über 2 Wochen. Am ersten und am letzten Tag wurde vor und 1 h nach der morgendlichen Tabletteneinnahme eine Blutprobe entnommen. Außerdem sammelten wir an beiden Tagen vom Zeitpunkt der ersten Blutentnahme an einen 12-h-Urin.

5.3.6 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Acetylsalicylsäure: Die Abbildung 12 zeigt die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ vor (Kontrolle), nach 100 mg ASA/2d (low dose) und nach 2 x 500 mg ASA/d (high dose).

Dazmegrel: Die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ wurde bei der gewählten Dosierung nach 7 Tagen um mindestens 90 % reduziert. (s. Abb. 13) Die 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung stieg am ersten Tag nicht signifikant an, fiel jedoch an den Tagen 7 und 14 wieder auf Ausgangswerte. Die Thromboxansynthesekapazität im Serum erniedrigte sich innerhalb von 30' nach oraler Applikation um mindestens 95 %.

Abbildung 13 zeigt den Verlauf der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung nach Dazmegrel.

ISDN: Abbildung 14 zeigt die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ am ersten Studientag und nach 2-wöchiger Einnahme von ISDN.

Die Synthesekapazität für Thromboxan B₂ in inkubiertem Vollblut ist aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 3: Synthesekapazität von inkubiertem Vollblut für TxB₂ vor und unter ISDN-Therapie

ng/ml; SEM	vor ISDN	1 h nach 80 mg ISDN
1. Studientag	550 +/- 166	570 +/-116 n = 14
14. Studientag 80-0-0 mg ISDN	930 +/- 347	620 +/-246 n = 7
14. Studientag 80-0-80 mg ISDN	360 +/- 110	500 +/-151 n = 7

Abbildung 12: 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung vor, nach low-dose und nach high-dose Acetylsalicylsäure

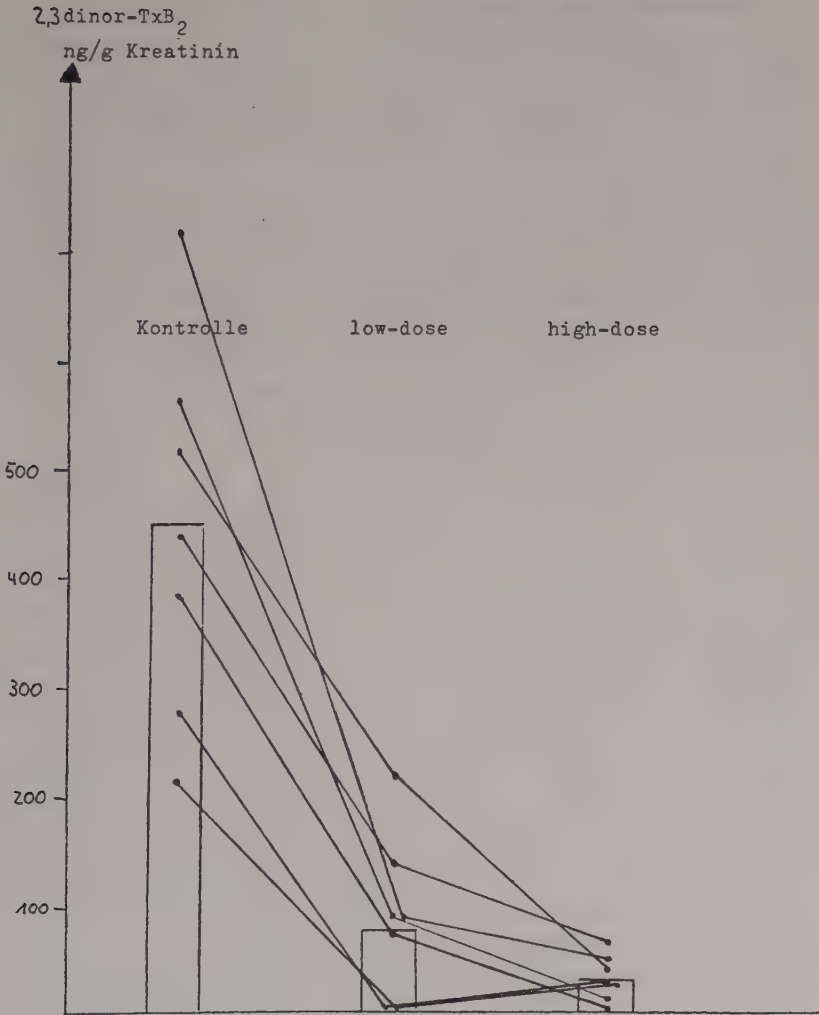


Abbildung 13: 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung vor und nach
Dazmegrel (3 x 200 mg)

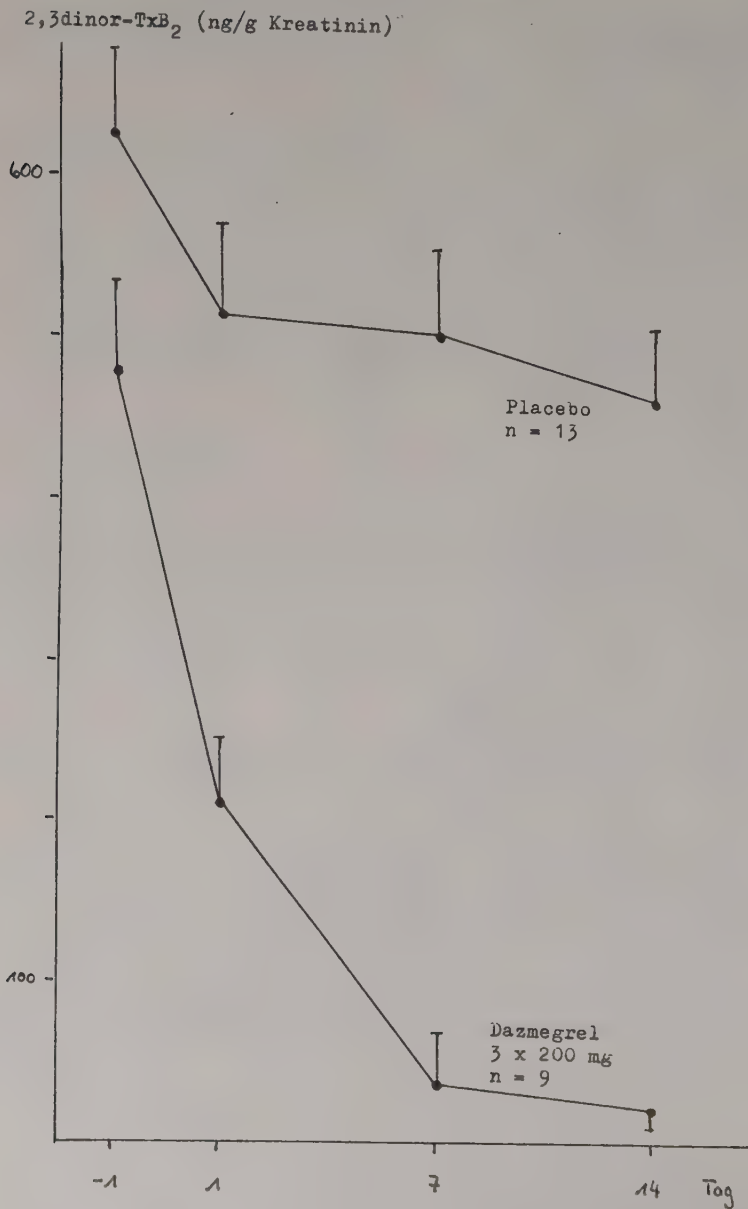
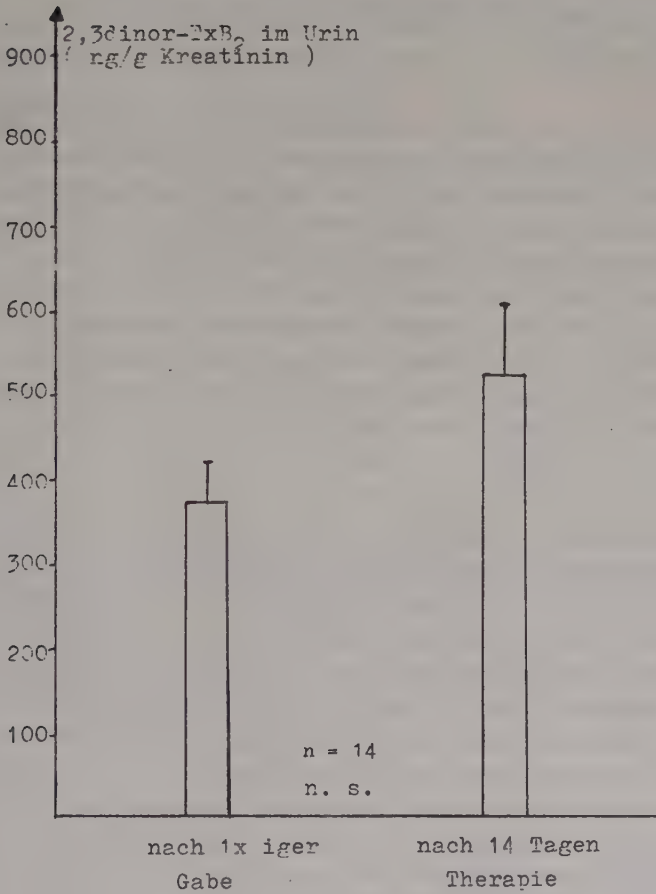


Abbildung 14: 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung am ersten Studientag und nach 2-wöchiger Einnahme von ISDN



6. Diskussion

6.1 Methode

Messung von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} im Urin:

Durch Infusion von Prostazyklin wurden die im Urin ausgeschiedenen Metaboliten identifiziert, wovon mit einem Anteil von 20,5 % 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} der wichtigste ist. (90, 91, 92) Die Messung dieses Metaboliten stellt eine verlässliche Näherung für die systemische Produktion von PGI₂ dar. Allerdings läßt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, daß ein Teil des im Urin erscheinenden 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} renalen Ursprungs ist. (30)

Durch die Verwendung einer hochspezifischen Messmethode, wie sie die GC-MS darstellt, kann man 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} praktisch ohne Beeinflussung durch andere ähnliche Substanzen bestimmen. Dies ließ sich durch die Recovery-Versuche eindrucksvoll zeigen.

Messung von 2,3 dinor-TxB₂ im Urin:

Analog zu den oben genannten Infusionsexperimenten wurden auch die im Urin ausgeschiedenen Metaboliten von Thromboxan A₂ identifiziert: 23 % des infundierten TxB₂ wurden als 2,3 dinor-TxB₂ im Urin ausgeschieden, wogegen nur 2,5 % unverändert wieder erschienen. Die übrigen 74,5 % verteilen sich auf eine ganze Reihe von Metaboliten, deren Anteile im Einzelnen jedoch deutlich unter 23 % lagen. (86, 87)

Aufgrund des hohen Anteils verschiedener Metabolite, deren Kreuzreaktion mit dem TxB₂-Antikörper unbekannt ist, reinigten wir die Urinproben mit Hilfe der HPLC, bevor wir den RIA durchführten. Die hohe Kreuzreaktion mit 2,3 dinor-TxB₂ läßt sich an einem Immunprofil der HPLC-Fractionen mit TxB₂-Antikörper ablesen. (Abbildung 15) Die Kreuzreaktion mit 2,3 dinor-TxB₂ lag bei 48 %. Andere kreuzreagierende Substanzen

wurden im Profil nicht eluiert.

Für Routineuntersuchungen ist diese Methode aus folgenden Gründen ungeeignet:

- die Reinigung mit HPLC ist zeit- und personalaufwendig
- die niedrige Recovery senkt die Nachweisgrenze des gesamten Verfahrens.

Möglichkeiten zur Vereinfachung:

Da der größte Teil der Immunoreaktivität von 2,3 dinor-TxB₂ stammt und viel höher ist als die von TxB₂ allein, (siehe Abb. 15), versuchten wir die Nachweisgrenze zu senken, indem wir Urin ohne HPLC-Trennung in den RIA einsetzen. Als Trägerlösung für den Eichkurven-Ansatz diente hierbei ein nahezu prostaglandinfreier Urin, den wir nach oraler Gabe von ASA und Indomethacin gewonnen hatten. Dieser "O-Urin" eliminiert im Gegensatz zum sonst verwendeten Inkubationspuffer die Träger-Effekte des Proben-Urins. Die Eichkurven für TxB₂ und 2,3 dinor-TxB₂ in diesem Ansatz zeigt Abbildung 16.

Die gewonnenen Werte für die 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung dürfen als grobes Maß für die systemische Thromboxanbildung gelten, wenn der ausgeschiedene Anteil von TxB₂ (renalen Ursprungs ?) so klein ist, daß er die Immunoreaktivität von 2,3 dinor-TxB₂ nicht beeinträchtigt. Deshalb bestimmten wir das Verhältnis von TxB₂ und 2,3 dinor-TxB₂ unter verschiedenen Bedingungen und verglichen Werte mit und ohne HPLC-Trennung vor dem RIA. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

- Die Werte mit und ohne HPLC sind vergleichbar. (Abb. 17)
- Falsch hohe Werte ergeben sich nur, wenn der TxB₂-Anteil über 1/8 des 2,3 dinor-TxB₂-Anteils liegt, was bei unseren Messungen sehr selten der Fall war. (Abb. 18)

Einem Urin zugesetztes 2,3 dinor-TxB₂ konnten wir mit einem

Korrelationskoeffizienten von $r = 0,95$ wiederfinden. (Abb.19) Die Interassay-Variabilität stellten wir mit 17,6 % fest ($n = 9$). Die Intraassay-Variabilität beträgt 4 % ($n = 20$). Daraus ist abzuleiten, daß für schnelle Screening-Untersuchungen der RIA ohne vorherige Trennung von TxB_2 und 2,3 dinor- TxB_2 ausreichend verlässliche Ergebnisse liefert. Auffällige Werte sollten bei klinischer Relevanz mit dem üblichen Verfahren (HPLC + RIA) kontrolliert werden.

Wir sind der Meinung, daß mit diesem RIA die renale Ausscheidung von 2,3 dinor- TxB_2 unter vielen physiologischen und pathologischen Bedingungen gemessen werden kann. Darüberhinaus ist die Methode bei vergleichbarer Spezifität und Genauigkeit weitaus weniger zeit- und kostenintensiv als die bisher beschriebenen Meßverfahren. (22, 23, 56)

An ein Screeningverfahren wird vor allem die Anforderung gestellt, bei einfacher, billiger und schneller Durchführung möglichst wenige falsch negative Resultate zu liefern. Unter dieser Voraussetzung kamen wir zu der Auffassung, daß eine einzelne Messung der 2,3 dinor- TxB_2 Ausscheidung zum Screening ausreichend ist, obwohl die 2,3 dinor- TxB_2 Ausscheidung an aufeinanderfolgenden Tagen Schwankungen unterworfen ist.

Daneben liefert die Messung der TxB_2 -Synthese in Blut ex vivo oder von PGI_2 durch Gewebe aus Blutgefäßen eine Aussage über die Synthesekapazität des jeweiligen Gewebes. Damit läßt sich eine Aussage machen über die Kapazitätsreserven des Thromboxan/Prostazyklin-Systems unter verschiedenen Bedingungen, jedoch nicht über die aktuelle Aktivitätslage des Systems.

Abbildung 15: Immunoreaktivität eines mit HPLC gereinigten Lipidextraktes aus Urin gegenüber dem TxB_2 -Antikörper

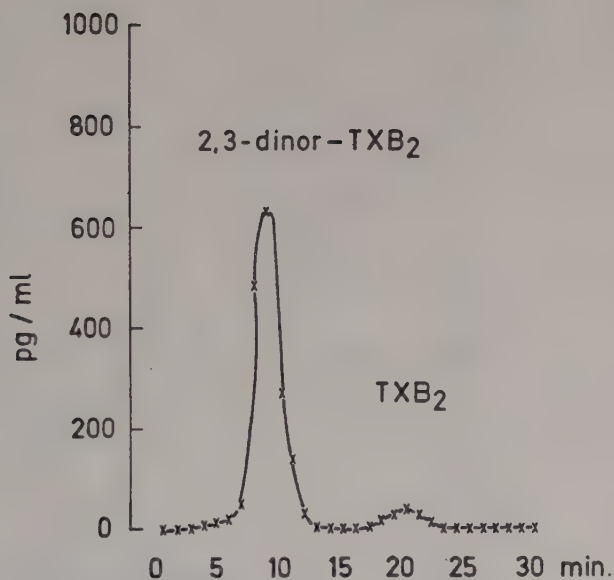


Abbildung 16: Eichkurven für TxB_2 und 2,3 dinor- TxB_2

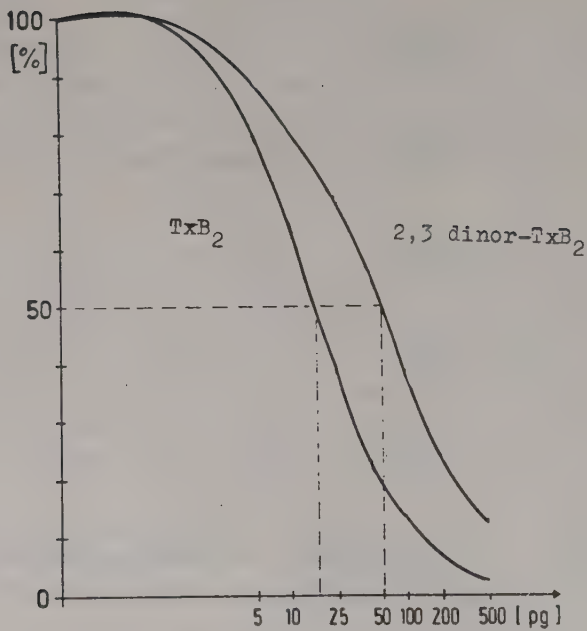


Abbildung 17: Vergleich der Ergebnisse der Messung von 2,3 dinor-TxB₂ mittels direktem RIA und mit RIA nach Reinigung mit Hilfe HPLC

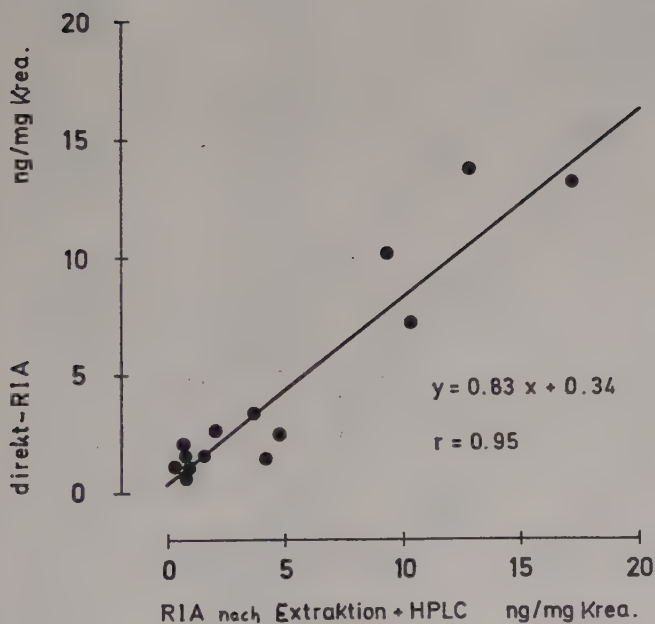


Abbildung 18: Abhängigkeit des Messwerts für 2,3 dinor-TxB₂ vom TxB₂-Anteil

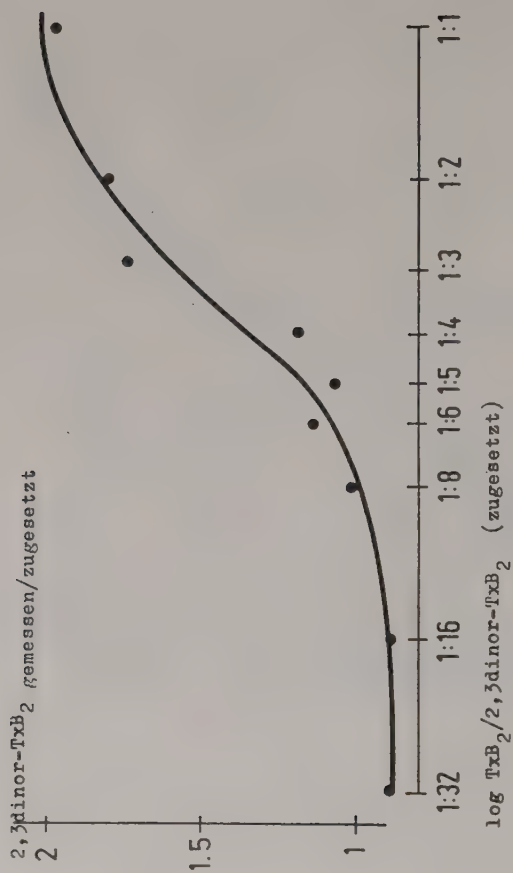
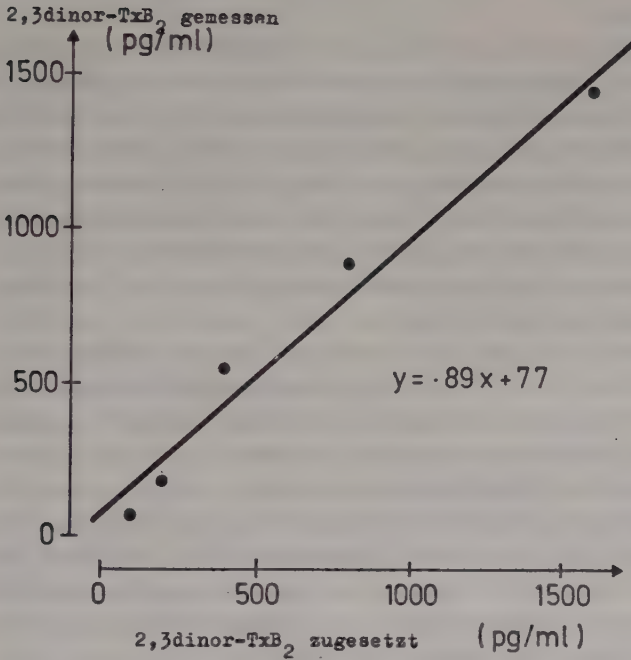


Abbildung 19: Wiederfindung von in physiologischen Mengen
einem Urin zugesetztem 2,3 dinor-TxB₂ mittels
direktem RIA



6.2 Physiologische Untersuchungen

Kleinkinder: Wir fanden bei Neugeborenen eine 15-fach höhere Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ im Vergleich zu Erwachsenen. Außerdem war das Verhältnis TxB₂/2,3 dinor-TxB₂ zugunsten des TxB₂ verschoben.

Aus dem steilen Abfall innerhalb der ersten Lebenstage läßt sich ableiten, daß entweder die Produktion von TxB₂ sinkt, oder daß die Ausscheidung und der Abbau von TxB₂ in Gang kommt, ohne daß erhöhte Mengen TxB₂ produziert werden. Im ersteren Fall müßte man eine Produktion von TxB₂ z.B. im Ductus arteriosus, in der Lunge oder in der Niere annehmen, die in den ersten Lebenstagen abnimmt. Im zweiten Fall könnte man die Werte mit einer verzögerten Ausscheidung des vorher gebildeten Thromboxan A₂ interpretieren.

Die gefundenen Werte deuten auf eine schlechte tubuläre Sekretion sowie auf eine schwache β -Oxidation und/oder erhöhte renale Produktion hin. Analog dazu war die 6 keto-PGF_{1 α} Ausscheidung bei Neugeborenen erhöht, wogegen 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} bei normalen Erwachsenenwerten lag.

Die erhöhte Prostazyklin-Produktion könnte sich möglicherweise als Reaktion auf die hohen Thromboxanspiegel erklären lassen. Andererseits bewirken auch die Kreislaufumstellungen der ersten Lebenstage Veränderungen im Prostaglandinstoffwechsel, die jedoch im einzelnen nicht bekannt sind. (97)

- So muß zum Verschluß des Foramen ovale zwischen den Vorhöfen der Druck im rechten Vorhof unter den Druck im linken Vorhof fallen. Dies ist nur möglich, wenn vasodilatierende Substanzen den pulmonalen Gefäßwiderstand des Neugeborenen massiv senken. Möglicherweise ist der therapeutische Verschluß des offenen Ductus arteriosus durch Zykllooxygenasehemmer durch eine Hemmung der Prostazyklinsynthese im Ductus bei bestehender

Aktivität der Endoperoxide zu erklären. (33, 42, 72)

- Innerhalb der ersten Lebenswoche wurde bei Neugeborenen ein rapider Anstieg des renalen Blutstroms festgestellt, der mit einem Abfall der TxB_2 - und 2,3 dinor- TxB_2 -Spiegel in Einklang zu bringen wäre. (47a)

Erwachsene: Wir fanden bei jungen Frauen eine signifikant höhere Ausscheidung von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} im Vergleich zu altersentsprechenden Männern. Bei Frauen nach der Menopause fanden wir niedrigere Spiegel von 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} . Diese Beobachtungen stehen in augenfälliger Übereinstimmung mit der Tatsache, daß bei jungen Frauen kardiovaskuläre Erkrankungen praktisch nicht vorkommen und deren Inzidenz mit Eintreten der Menopause dramatisch steigt. (34) Bisher ist allerdings noch nicht geklärt, ob und wie die Veränderung des Hormonhaushaltes mit dem Prostglandin- bzw. Kreislaufsystem in kausalem Zusammenhang steht.

Einerseits wurden klinische Studien durchgeführt, die nur eine geringe anti-atherosklerotische Wirkung von Östrogenen bei postmenopausalen Frauen ergaben. (107) Andererseits muß man wegen der geringen Halbwertszeit und der niedrigen Spiegel auch die systemische Wirksamkeit von uterin gebildetem Prostazyklin in Zweifel ziehen. (98)

Wir konnten nicht klären, ob die verringerte PGI₂-Produktion mit der Menopause in kausalem Zusammenhang steht oder nur Ausdruck einer sinkenden Syntheseleistung im Alter ist. (48) Ein mögliches Bindeglied zwischen Östrogen- und Prostaglandinstoffwechsel könnte die Beeinflussung der Plasmalipide durch Östrogene sein. (2)

Aufgrund der niedrigen Fallzahl und der fehlenden Angaben über Nikotingenuß und Zeitpunkt innerhalb des Zyklus bei unseren weiblichen Versuchspersonen muß die Bewertung der Daten mit äußerster Zurückhaltung erfolgen.

6.3 Klinische Untersuchungen

Bei vielen Krankheitsbildern wird eine Störung des Gleichgewichts zwischen Prostazyklin und Thromboxan als ein Glied in der Pathogenese vermutet: (108)

- essentielle Hypertonie (112)
- koronare Herzerkrankung (43, 61)
- venöse Thromboembolien (49)
- Diabetes mellitus (17, 102)
- thrombozytopenische Purpura (11)
- septischer Schock (85)
- Transplantatabstoßung (32)
- Barrter-Syndrom (36)
- catamenial Pneumothorax (50) u. a.

Wir untersuchten die Urin-Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} im Urin von Patienten mit koronarer Herzerkrankung, Patienten mit Diabetes mellitus und von klinisch gesunden Rauchern.

Koronare Herzerkrankung, Atherosklerose: Thromboxan und Prostazyklin als potente Regulatoren der Thrombozyten-Endothel-Interaktion könnten bei der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen. (30)

Tabelle 4: Untersuchungen zur Rolle von Thromboxan A_2 bei Pathogenese der koronaren Herzerkrankung.

Teil a: Messungen im Plasma

Ref.-Nr	Untersuchungsbedingungen
109	Plasma-TxB ₂ nach Ligatur d. vorderen Koronararterie
43	Plasma-TxB ₂ bei Patienten mit Herzinfarkt und Thrombolysetherapie
88	Plasma-TxB ₂ im Koronarsinus bei Ischämie Plasma-TxB ₂ bei vasospastischer Angina pectoris

Die oben aufgeführten Untersuchungen beziehen sich auf Werte, die aus Plasmaproben stammen und wegen unvermeidlicher Störungen der endogenen Spiegel durch die Probengewinnung in Frage gestellt wurden. (30) Die Messung der Urin-Metaboliten verspricht weit verlässlichere Aussagen, obwohl das kleine Ursprungsgebiet bei ischämischer Herzerkrankung nur geringe Änderungen der Ausscheidung von Prostanoid-Metaboliten erwarten läßt. (31)

Tabelle 4: Untersuchungen zur Rolle des Thromboxan A_2 bei der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung

Teil b: Messung im Urin

Ref.-Nr	Untersuchungsbedingungen
61	2,3 dinor-TxB ₂ nach Herz-OP
31	2,3 dinor-6 keto-PGF _{1α} bei Patienten mit schwerer Atherosklerose
49	2,3 dinor-TxB ₂ bei Patienten mit venöser Thrombose

Bei unseren Untersuchungen konnten wir keine signifikanten Änderungen des Thromboxan/Prostazyklin-Gleichgewichts feststellen, was sicher zum Teil an der durchgeführten Therapie und ihren Auswirkungen liegt.

Diabetes mellitus ist ein gut belegter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. (34) Mögliche Veränderungen im Prostanoidstoffwechsel wurden von mehreren Autoren untersucht.

Tabelle 5: Veränderungen im Prostazyklin-Thromboxan-System bei Diabetes mellitus

Ref.-Nr.	Untersuchungsbedingungen
17	6 keto-PGF _{1α} im Plasma bei Diabetikern
12	6 keto-PGF _{1α} im Plasma von Diabetikern und Gesunden
105	Prostazyklinsynth. in Nabelschnüren diabet. Mütter
89	Prostazyklinsynthese von Gefäßbiopsie-Material
102	Synthesekapazität für Prostazyklin bei Diabetikern

Da die Plasmaspiegel mit RIA gemessen wurden und um den Faktor 30 über den Werten liegen, die nach HPLC-Trennung der Plasma-Lipide gemessen werden können, ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen stark anzuzweifeln. (99) Ebenso sagt die Synthesekapazität des vaskulären Gewebes nichts aus über dessen tatsächliche Syntheseleistung in vivo, da selbst bei

pathologischen Zuständen die Kapazität oft nicht ausgelastet wird. (31)

Wir fanden bei Patienten mit Typ-I-Diabetes mit gesicherter Neuropathie eine signifikant erhöhte 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung, wogegen die 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung nicht signifikant verändert war.

Eine beim Diabetes festgestellte erhöhte Aktivierbarkeit der Thrombozyten (102) steht in Einklang mit der von uns gefundenen höheren Thromboxanproduktion im Gefäßsystem.

Eine von mehreren Autoren (siehe Tabelle) beschriebene Verminderung der Prostazyklin-Produktion bei Diabetikern konnten wir nicht nachweisen.

Die genannten Befunde könnten eine fehlende Reaktion der Endothelzellen auf die erhöhten Thromboxanspiegel anzeigen. Sowohl die zitierten Untersuchungen als auch unsere eigenen Befunde legen die Vermutung nahe, daß die diabetische Angiopathie mit einer Verschiebung des Thromboxan-Prostazyklin-Gleichgewichts assoziiert ist.

Hypertonus: Arterieller Hochdruck ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose. Ein dabei festgestelltes Ungleichgewicht der Produktion von Thromboxan und vaskulärer Prostaglandine läßt sich nicht eindeutig als Ursache, Vermittler oder Folge der hypertonen Gefäßreaktion einordnen. (114)

Rauchen stellt einen weiteren wichtigen Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose dar. (116) In verschiedenen Untersuchungen wurde versucht, die Auswirkungen des Rauchens auf das Prostaglandinsystem aufzuklären.

Tabelle 6: Auswirkungen des Rauchens auf das Prostaglandin-system

Ref.-Nr	Untersuchungsmaterial
10	Nikotininfusion bei Hunden
104	Prostazyklinsynthese in Nabelschnüren von Raucherinnen
115	6 keto-PGF _{1α} im Perfusat von Kaninchenherzen
117	Dosisabhängige Hemmung der Prostazyklinproduktion
64	6 keto-PGF _{1α} im Plasma
1	Prostazyklinproduktion in Rattenaorta
9	Plättchenaggregabilität bei Raucher und Nicht-rauchern

Die meisten der o. g. Untersuchungen deuten auf eine direkte Hemmung der Zyklooxygenase durch Nikotin hin. Dabei scheint die endotheliale Zyklooxygenase empfindlicher zu sein als die thrombozytäre. Zusammen mit einer direkten Schädigung des Endothels scheint daraus eine Aktivierung der Thrombozyten zu resultieren. Das Endothel ist aufgrund der Hemmung nicht in der Lage, eine adäquate Menge Prostazyklin auszuschütten. Diese Befunde konnten wir in unseren Untersuchungen nur teilweise nachvollziehen. So fanden wir bei Rauchern eine nicht signifikante Erniedrigung der 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1 α} Ausscheidung, die anhand der vorliegenden Literatur deutlicher zu

erwarten gewesen wäre. Dies läßt sich entweder durch den niedrigen Zigarettenkonsum unserer Probanden oder durch die schnellere Erholung des Endothels in vivo als in vitro erklären.

Wir fanden bei Rauchern eine signifikant höhere Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂. Diese Beobachtung läßt eine Aktivierung von Thrombozyten durch eine Schädigung des Endothels vermuten und stimmt mit dem Befund überein, daß die thrombozytäre Zyklooxygenase weniger empfindlich gegenüber Nikotin ist.

6.4 Pharmakologische Untersuchungen

Bei der Entstehung arterieller Thromben wird dem Gleichgewicht zwischen Thromboxan und Prostazyklin eine wichtige Rolle zugeschrieben. (5) Bei der Behandlung und Verhütung von Thrombose, Atherosklerose und koronarer Herzerkrankung besteht z. Zt. der wesentliche Ansatz darin, die Funktion der Thrombozyten durch eine Hemmung der thrombozytären Prostaglandinbildung zu hemmen. Dieses Ziel wird auf verschiedenen Wegen zu erreichen versucht.

- Ein häufig gewählter Angriffspunkt ist die Hemmung der Zyklooxygenase durch Medikamente wie Acetylsalicylsäure und die meisten anderen nichtsteroidalen Entzündungshemmer (NSAID). Das Problem dieser Methode liegt darin, daß durch Hemmung der Zyklooxygenase möglicherweise auch die erwünschten Effekte des Prostazyklins verlorengehen, da dieses ebenfalls über die Zyklooxygenase gebildet wird. Diesen unerwünschten Effekt versucht man über verschiedene Darreichungs- und Dosierungsformen zu minimieren. (s.u.)

- Ein anderer Ansatz ist die selektive Hemmung der Thromboxan-Synthetase durch Imidazol-Derivate. (66) Dieses Verfahren

hat den Vorteil, daß die erwünschten Prostazyklinwirkungen nicht beeinträchtigt werden. Durch einen Stau der Endoperoxide vor der blockierten Thromboxansynthetase wäre eventuell sogar eine Umleitung in die Prostazyklinsynthese möglich. (13) Nach Einnahme verschiedener Thromboxansynthetasehemmer wurde in verschiedenen Studien übereinstimmend eine starke Reduktion der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung beobachtet, wobei jedoch der Anstieg der 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung fraglich war. (27, 28) Ein weiterer limitierender Faktor dieses Ansatzes ist die Beobachtung, daß PG-Endoperoxide selbst eine TZ-Aggregation auslösen können. (37a)

Die hemmende Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die Prostaglandinsynthese besteht in einer irreversiblen Acetylierung der Zyklooxygenase. (93) Diese Reaktion führt zu einer vollständigen Blockierung der Prostaglandinsynthese in Thrombozyten für ihre gesamte restliche Lebensdauer, da sie als kernlose Zellen nicht in der Lage sind, neues Enzymprotein zu bilden. (6) Eine Erholung der thrombozytären Prostaglandinsynthese erfolgt daher parallel zum Eintritt neuer Thrombozyten in die Zirkulation über einen Zeitraum von 8 Tagen. (6, 16) Bereits bei einem Anteil von 10 % nicht blockierter Thrombozyten ist jedoch die in vitro Aggregation voll wiederhergestellt, unabhängig von der Thromboxan-Synthesekapazität im Blut. (79) Deshalb ist die Messung der TxB₂-Bildung in inkubiertem Vollblut für die Beurteilung der Thrombozytenaktivierbarkeit von geringem Wert. (80) Da die Zyklooxygenase der Endothelzellen und damit deren Prostazyklinsynthese ebenfalls durch ASA gehemmt wird, ist eine Beurteilung der klinischen Wirksamkeit von größerer Bedeutung. (79)

Tabelle 7: Klinische Studien zur antithrombotischen Wirksamkeit von ASA

Ref.-Nr	Untersuchungsmaterial
59	Verschluß- und Embolierate nach aorto-koronarem Bypass
39	Thromboserate nach Hüftendoprothesenimplantation
76	Thromboserate bei Mitralklappenersatz
51	Verschlußrate von iliacalen Kunststoffgefäßprothesen
44	Thrombozytenfunktion und klinische Parameter nach Infarkt

Als Zusammenfassung dieser ausgewählten klinischen Studien ergibt sich folgendes Bild: Eine gesicherte Wirkung von ASA auf die untersuchten Parameter läßt sich nicht immer finden. Bei allen Studien, die verschieden hohe Dosen miteinander verglichen, waren die erwünschten Wirkungen durch die jeweils niedrigste Dosis zu erzielen. Im Hinblick auf die dosisabhängigen Nebenwirkungen läßt sich daraus eine Empfehlung für eine möglichst niedrige Dosierung von ASA ableiten. (44)

Trotz zahlreicher biochemischer, tierexperimenteller und klinischer Untersuchungen ist die ideale Dosierung von Acetylsalicylsäure nach wie vor umstritten. Die Verfechter einer niedrigen Dosierung erhoffen sich eine direkte, präsystemische sozusagen "pseudo"-selektive Wirkung auf die Thrombozyten

ohne systemische Wirkung am Endothel aufgrund einer hohen first-pass Eliminierung der ASA in der Leber. Dagegen glauben die Anhänger der high-dose Theorie durch intermittierende Gaben von ASA eine Erholung des Endothels zu ermöglichen, sowie eine direkte, wenn auch mechanistisch nicht verstandene Wirkung auf die Aktivierungsreaktion der Thrombozyten ausüben zu können. (15, 29, 38, 46, 62, 63, 80, 82, 83, 103)

Wir untersuchten die Auswirkungen von low dose versus high dose ASA auf die 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung gesunder männlicher Probanden. Dabei konnten wir bereits durch intermittierende Gabe von 100 mg ASA jeden zweiten Tag eine erhebliche Reduktion der 2,3 dinor-TxB₂-, aber auch der 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}-Ausscheidung feststellen. Bei Applikation von 2 x 500 mg ASA/d fanden wir eine noch stärkere Hemmung der Thromboxansynthese, wogegen die 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung nicht signifikant anstieg.

Letzterer Befund steht im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Untersucher und wäre mit einer Wirkung von ASA an der Zyklooxygenase nicht zu vereinbaren. Wir vermuten, daß durch die nur eintägige Gabe der hohen ASA-Dosis im Serum der Probanden noch Prostazyklinmetaboliten zirkulierten, die verzögert über die Niere ausgeschieden wurden. Sollte dies zutreffen, liesse sich daraus ableiten, daß die Metabolisierung zu nierengängigen Endprodukten bei Prostazyklin länger dauert als bei Thromboxan.

Wir untersuchten das Imidazolderivat Dazmegrel in einer 2-wöchigen Studie. Dabei fanden wir eine mehr als 90 %ige Reduzierung der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung. Am Tag 1 fanden wir eine leichte Erhöhung der 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung, die jedoch an den Tagen 7 und 14 nicht mehr nachweisbar war. Man könnte vermuten, daß zu Anfang der erwartete Endoperoxid-Shift stattfindet, später aber wegen der gehemmten Tx-Synthese in Plättchen mit nachfolgender Plättchen-

hemmung seltener eine reaktive vaskuläre PGI₂-Synthese ausgelöst wird.

Nach unseren Ergebnissen empfiehlt sich eine Gabe des Medikaments 3 x täglich, um eine durchgehende Blockierung der Thromboxansynthese zu erreichen.

Der therapeutische Ansatz, die TxA₂-Synthese selektiv zu hemmen, wurde inzwischen verworfen, weil die durch den Stau vermehrt freigesetzten Endoperoxide die Thrombozytenaggregation in gleicher Weise fördern wie dies durch Thromboxan A₂ physiologisch geschieht. Die pharmakologische Wirkung von Dazmegrel auf Thrombozytenaggregation und Blutungszeit ist daher gering.

Isosorbiddinitrat: Die Wirksamkeit der Nitrate bei kardiovaskulären Erkrankungen ist seit langem bekannt. Sie beruht auf einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vor allem der venösen Kapazitätsgefäße. Dadurch wird am Herzen besonders die Vorlast gesenkt. Die daraus resultierende Verminderung der kardialen Wandspannung vermehrt den koronaren Blutstrom und verbessert so die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur. Diese Wirkungen machten Nitrate lange Zeit zum Mittel der ersten Wahl bei Angina pectoris.

Da eine in vitro Wirkung der Nitrate jedoch erst bei Konzentrationen erzielt wird, die weit über den in vivo therapeutisch erreichten Spiegeln liegen, vermutet man, daß die Wirkung nicht direkt durch die Nitrate, sondern durch einen vermittelnden Mechanismus ausgeübt wird. Durch verschiedene Beobachtungen war der Eindruck entstanden, daß diese Vermittlerrolle vom Prostaglandinsystem ausgeübt würde. (57, 14, 26)

Wir fanden bei unserer Studie mit Isosorbiddinitrat keine signifikanten Auswirkungen auf die Ausscheidung von 2,3 dinor-TxB₂ und 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α}:

Auch bei Patienten mit Standardtherapie bei koronarer Herz-erkrankung (alle mit Nitroverbindungen) fanden wir keine sig-nifikanten Veränderungen der Ausscheidung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten. Wir sind deshalb der Meinung, daß Ni-trate nicht über eine Veränderung der Thromboxan- bzw. Prosta-zyklinsynthese wirken.

In letzter Zeit wird ein Prostaglandin-unabhängiger Wirkungs-mechanismus der Nitrate diskutiert, der über cGMP vermittelt sein soll. cGMP ist wie cAMP ein intrazellulärer second mes-senger, der über die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration auch mit dem Prostaglandinsystem in Verbindung steht. (53)

Die Schwierigkeiten der antithrombotischen Therapie mit Zyk-loxygenase- und Thromboxansynthetasehemmern haben die Suche nach neuen Therapieansätzen intensiviert.

Ein neuer Ansatz der thrombozytenhemmenden Therapie besteht in der Blockierung der Thromboxanrezeptoren auf der Oberflä-che der Thrombozyten. (95) Die zum Thromboxan strukturver-wandte 13-aza-Prostansäure blockiert die Bindungsstellen für TxA_2 auf der Thrombozytenmembran, ohne die cAMP-Spiegel oder die Reaktion auf Prostazyklin zu verändern. (45) Allerdings konnte im Tierversuch lediglich eine Wirkung auf thrombozy-täre Rezeptoren nachgewiesen werden, während die vasokonstrik-torische Wirkung des Thromboxans erhalten bleibt. (7)

Aus Beobachtungen über eine niedrige Inzidenz von kardio-vaskulären Erkrankungen in Populationen, die sich überwie-gend von Fisch ernähren, wurde ein Zusammenhang zwischen dem Fettsäurespektrum der Nahrung und der Inzidenz der Atheroskle-rose abgeleitet. (52) Die von der Eicosapentaensäure, einer vorwiegend in Fisch vorkommenden ungesättigten Fettsäure, abgeleiteten Prostaglandine mit drei Doppelbindungen unter-scheiden sich in ihrem Wirkungsspektrum von den Prostaglandinen

mit zwei Doppelbindungen: während PGI_2 und PGI_3 nahezu gleich wirksam sind, ist TxA_3 weitaus schwächer als TxA_2 . (75, 73)
Möglicherweise bietet die Anreicherung der Nahrung mit Eicosapentaensäure einen neuen Ansatz zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen. (60, 110, 100)

7. Zusammenfassung

Ausgehend von der Hypothese, daß bei vielen Krankheitsbildern der Prostanoidstoffwechsel gestört ist, versuchten wir, das Prostazyklin-Thromboxan-Verhältnis unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Dabei wählten wir als nicht invasive Methode die Messung von PGI_2 - und TxA_2 -Metaboliten im Urin als Maß für die systemische Produktion.

2,3 dinor-6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, ein enzymatisches Abbauprodukt von Prostazyklin bestimmten wir mit der hochspezifischen Methode der Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Den Urin-Metaboliten von TxA_2 , 2,3 dinor- TxB_2 , quantifizierten wir mit Hilfe eines Radioimmunoassays nach Reinigung und Trennung über HPLC.

Mit diesen Verfahren untersuchten wir folgende Personengruppen:

1 Kleinkinder am 3. und 5. Lebenstag sowie im 3. Lebensjahr. Kleinkinder hatten ggü. Erwachsenen eine stark erhöhte Ausscheidung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten. Dabei war bei den Kindern der Anteil der Metaboliten mit ungekürzter Seitenkette im Vergleich zu Erwachsenen erhöht.

2 Gesunde junge Männer. Wir fanden eine mittlere Ausscheidung von 480 ng 2,3 dinor- TxB_2 /g Kreatinin, die bei Rauchern im Mittel 610- und bei Nichtraucher 350 ng/g Kreatinin betrug. Die Mittelwerte der 2,3 dinor-6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ Ausscheidung waren mit 120 bzw. 90 ng/g Kreatinin nicht signifikant unterschiedlich.

3 Gesunde junge Männer vor und nach oraler Gabe des Zyklo-
genase-Blockers Acetylsalicylsäure. Dabei fanden wir bei einer Dosierung von 100 mg jeden 2. Tag eine Reduzierung des 2,3 dinor- TxB_2 um 83 % und bei einer Dosierung von 2 x 500 mg/ um 92 %.

4 Gesunde junge Männer vor und nach oraler Gabe des selektiven Thromboxan-Synthetase-Hemmers Dazmegrel. Eine Reduzierung der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung um mindestens 90 % und eine Senkung des Serum-TxB₂ um mind. 95 % 30' nach oraler Applikation wurde nachgewiesen.

5 Koronarkranke Patienten unter verschiedenen Therapieformen. Es ergaben sich weder im Vergleich der Therapien noch im Vergleich zu Normalpersonen signifikante Unterschiede der 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung und des Serum-TxB₂.

6 Patienten mit diabetischer Neuropathie. Die mittlere 2,3 dinor-TxB₂ Ausscheidung war mit 1400 ng/g Kreatinin gegenüber Normalpersonen deutlich erhöht, wegegen die 2,3 dinor-6 keto-PGF_{1α} Ausscheidung mit 130 ng/g Kreatinin nicht signifikant verändert war.

Da der Einsatz als Screeningverfahren an der zeitaufwendigen Durchführung der HPLC scheitert, versuchten wir den RIA für 2,3 dinor-TxB₂ zu vereinfachen:

Die Messung von 2,3 dinor-TxB₂ in einem RIA unter Verwendung eines TxB₂-Antikörpers ohne Trennung von TxB₂ und 2,3 dinor-TxB₂ ist möglich, wenn a) die ausgeschiedene Menge TxB₂ sehr klein ist im Verhältnis zum ausgeschiedenen 2,3 dinor-TxB₂ und b) die Eichkurve in einem TxB₂-und 2,3 dinor-TxB₂-freien Urin angesetzt wird.

Der zuverlässige Meßbereich des RIA's liegt bei einem Verhältnis von TxB₂/2,3 dinor-TxB₂ von 1/8 bis 1/30. Innerhalb dieses Meßbereichs ließ sich eine konstante Wiederfindrate von 2,3 dinor-TxB₂ nachweisen. Unter noch weiter zu bestimmenden Rahmenbedingungen stellt die Messung von 2,3 dinor-TxB₂ im Urin mit einem direkten RIA möglicherweise eine einfache, nicht invasive und für manche klinische Fragestellungen hinreichend genaue Methode dar.

LITERATUR

Literaturangaben verstehen sich als Band; Nr; Seite; (Jahr)

- 1 Alster P; Wennmalm A;
Effect of nicotine on prostacyclin formation in rat aorta
Europ. J. Pharmacol. 86; 441-446; (1983)
- 2 Barrett-Connor E; Brown WV; Turner J; Austin M;
Crique MH;
Heart disease risk factors and hormone use in postmenopausal
women
JAMA 241; 20; 2167-2169; (1979)
- 3 Blair IA; Barrow SE; Waddell KA; Lewis PJ; Dollery CT;
Prostacyclin is not a circulating hormone in man
Prostaglandins 23; 4; 579-589; (1982)
- 4 Borda ES; Lazzari MA; Gimeno MF; Gimeno AL;
Human platelet rich plasma and human serum protects from
inactivation the antiaggregatory capacity of prostacyclin-
like material (PGI₂) produced by the rat stomach fundus
Prostaglandins 19; 6; 899-905; (1980)
- 5 Bunting S; Moncada S; Vane JR;
The Prostacyclin-Thromboxane A₂ balance: pathophysiological
and therapeutical implications
Br. Med. Bull. 39; 3; 271-276; (1983)

- 6 Burch JW; Stanford N; Majerus PW;
Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral
aspirin
J. Clin. Invest. 61; 314-319; (1978)
- 7 Burke SE; Roth DM; Lefer AM;
Antagonism of platelet aggregation by 13-azaprostanoic acid
in acute myocardial ischemia and sudden death
Thromb. Res. 29; 473-488; (1983)
- 8 Cannon P
Eicosanoids and the blood vessel wall
Circulation; 70; 4; 523; (1984)
- 9 Carlsson I; Wennmalm A;
Platelet aggregability in smoking and non-smoking subjects
Clin. Physiology 3; 565-571; (1983)
- 10 Che Su;
Actions of nicotine and smoking on circulation
Pharmacol. Ther. 17; 129-141; (1982)
- 11 Chen YC; Hall ER; McLeod B; Wu KK;
Accelerated prostacyclin degradation in thrombotic
thrombocytopenic purpura
Lancet 2; 267-269; (1981)
- 12 Davis TME; Brown E; Finch DR; Mitchell MD; Turner RC;
In vitro venous prostacyclin production, plasma
6 keto-PGF_{1α}-concentrations and diabetic retinopathy
Br. Med. J. 282; 1259-1262; (1981)

- 13 Defreyn G; Deckmyn H; Vermylen J;
A thromboxane synthetase inhibitor reorients endoperoxide
metabolism towards prostacyclin and prostaglandin E2
Tromb. Res. 26; 389-400; (1982)
- 14 DeCaterina R; Dorso CR; Tack-Goldmann K; Weksler BB;
Nitrates and endothelial prostacyclin production: studies
in vitro
Circulation 71; 1; 176-82; (1985)
- 15 De Gaetano G; Cerletti C; Dejana E; Latini R; Villa S;
The "Aspirin Dilemma": New Points for Discussion
Thromb. Haemostas. 52; 5; 365; (1984)
- 16 Di Minno G; Silver MJ; Murphy S;
Monitoring the entry of new platelets into the circulation
after ingestion of aspirin
Blood 61; 6; 1081-1085; (1983)
- 17 Dollery CT; Friedman LA; Hensby CN; Kohner E; Lewis PJ;
Porta M; Webster J;
Circulating prostacyclin may be reduced in diabetes
Lancet 2; 1365; (1979)
- 17a Dumbs A;
Prostaglandin-Ausscheidung im Urin bei Neugeborenen
Beziehung zu Nierenfunktion und Blutdruck
Dissertation LMU München 1981
- 18 Dusting GJ; Moncada S; Vane JR;
Recirculation of Prostacyclin in the dog
Br. Jour. Pharmacol. 64; 315-320; (1978)

19 Euler US von

Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets

Kli. Wo. 14; 1182-1183; (1935)

20 Falardeau P; Oates JR; Brash A

Quantitative analysis of two dinor urinary metabolites of Prostacyclin

Anal. Biochem. 115; 359-367; (1981)

21 Fischer S; Bernutz C; Meier H; Weber PC

Formation of prostacyclin and thromboxane in man as measured by its main urinary metabolites

Biochem. Biophys. Acta 876; 194-9; (1986)

22 Fischer S; Scherer B; Weber PC

Prostacyclin metabolism in adults and neonates: Urinary profiles of 6 keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ and 2,3 dinor-6 keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ studied by gaschromatography-mass-spectrometrie

Biochim. Biophys. Acta 750; 127-133; (1983)

23 Fischer S; Scherer B; Weber PC;

Prostacyclin metabolites in urine of adults and neonates, studied by gaschromatography-mass spectrometry and radio-immunoassay

Biochim. Biophys. Acta 710; 493-501; (1982)

24 Fischer S; Struppler M; Böhlig B; Bernutz C; Wober W; Weber PC;

The influence of selective thromboxane synthetase inhibition by a novel imidazole derivate, UK-38,485, on prostanoid formation in man

Circulation 68; 4; 821-6; (1983)

- 25 FitzGerald GA; Brash AR; Falardeau P; Oates JR;
Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation
of normal man
Journ. Clin. Invest. 68; 1272-1276; (1981)
- 26 Fitzgerald DJ; Robertson RM; FitzGerald GA;
The effects of organic nitrates on prostacyclin biosynthesis
and platelet function in humans
Circulation 70; 2; 297-307; (1984)
- 27 FitzGerald GA; Brash AR; Oates JA; Pedersen AK;
Endogenous prostacyclin biosynthesis and platelet function
during selective inhibition of thromboxane synthase in man
J. Clin. Invest. 71; 1336-1343; (1983)
- 28 FitzGerald GA; Oates JA;
Selective and non selective inhibition of thromboxane for-
mation
Clin. Pharmacol. Ther. 35; 5; 633-640; (1984)
- 29 FitzGerald GA; Oates JA; Hawiger J; Maas RL; Roberts JL2;
Lawson JA; Brash AR;
Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and
platelet function during chronic administration of aspirin
in man
J. Clin. Invest. 71; 676-688; (1983)
- 30 FitzGerald GA; Pedersen AK; Patrono C;
Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in
cardiovascular disease
Circulation 67; 6; 1174-1177; (1983)

- 31 FitzGerald GA; Smith B; Pedersen AK; Brash AR;
Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe
atherosclerosis and platelet activation
New Engl. Journ. Med. 310; 17; 1065-1068; (1984)
- 32 Foegh M; Zmudka M; Cooley C; Winchester JF; Helfrich GB;
Ramwell PW; Schreiner GE;
Urine $i\text{-TxB}_2$ in renal allograft rejection
Lancet 2; 430-434; (1981)
- 33 Friedman WF; Hirschklau MJ; Printz MP; Pitlick PT;
Kirkpatrick SE;
Pharmacologic closure of patent ductus arteriosus in the
premature infant
New Engl. Journ. Med. 295; 10; 526-529; (1976)
- 34 Gordon T; Kannel WB; Hjortland MC; McNamara PM;
Menopause and coronary heart disease; The Framingham study
Ann. Int. Med. 89; 2; 157-161; (1978)
- 36 Güllner HG; Bartter FC; Cerletti C; Smith JB; Gill JR jr;
Prostacyclin overproduction in Bartter's syndrome
Lancet 2; 767-768; (1979)
- 37 Hamberg M; Svensson J; Samuelsson B;
Thromboxanes: A new group of biologically active compounds
derived from prostaglandin-endoperoxides
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72; 8; 2994-2998; (1975)
- 37a Hamberg M; Svensson J; Wakabayashi T; Samuelsson B;
Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides
that cause platelet aggregation
Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 71; 2; 345-349; (1974)

- 38 Hanley SP; Bevan J; Cockbill SR; Heptinstall S;
A regimen for low dose aspirin ?
Br. Med. J. 285; 1299-1302; (1982)
- 39 Harris WH; Salzman EW; Athanasoulis CA; Waltman AC;
De Sanctis RW;
Aspirin Prophylaxis of venous thromboembolism after total
hip replacement
New Engl. Journ. Med. 297; 1246-1249; (1977)
- 40 Harrison H; Reece A; Johnson M;
Decreased vascular prostacyclin in experimental diabetes
Life Sciences 23; 351-356; (1978)
- 41 Hensby CN; Dollery CT; Barnes PJ; Dargie H;
Production of 6 oxo-prostaglandin- $F_{1\alpha}$ by human lung in vivo
Lancet 2; 1162; (1979)
- 42 Heyman MA; Rudolph AM; Silverman NH;
Closure of the ductus arteriosus in premature infants by
inhibition of prostaglandin synthesis
New Engl. Journ. Med. 295; 10; 530-533; (1976)
- 43 Hirsh PD; Hillis LD; Campbell WB; Firth BG; Willerson JT;
Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary
circulation in patients with ischemic heart disease
New Engl. Journ. Med. 304; 12; 685-691; (1981)
- 44 Hoffmann W; Foerster W; Mest HJ; Taube C; Block HV;
Braun H;
Reduced side effects by low dose of acetylsalicylic acid (ASA)
in patients with myocardial infarction; estimations of serum
thromboxane B₂ and PGF_{2\alpha}
Biomed. Biochim. Acta 43; 8+9; 467-470; (1984)

- 45 Hung DC; Ghali NI; Venton DL; Le Breton GC;
Specific binding of the thromboxane A2 antagonist
13-azaprostanoic acid to human platelet membranes
Bioch. Biophys. Acta 728; 171-178; (1983)
- 46 Jaffe EA; Weksler BB;
Recovery of endothelial cell prostacyclin production after
inhibition by low doses of aspirin
J. Clin. Invest. 63; 532-535; (1979)
- 47 Johnson R; Morton D; Kinner J; Gorman R; McGuire J;
Sun F;
The chemical structure of prostaglandin X (Prostacyclin)
Prostaglandins 12; 915-928; (1976)
- 47a Joppich R; Scherer B; Weber PC;
Renal prostaglandins: Relationship to blood pressure, sodium
and water excretion in pre- and full-term infants
Eur. J. Pediatr. 132; 253-259; (1979)
- 48 Kent RS; Kitchell BB; Shand DG; Whorton AR;
The ability of vascular tissue to produce prostacyclin
decreases with age
Prostaglandins 21; 3; 483-490; (1981)
- 48a Kisslinger G;
Blutdruckverhalten gesunder Kinder im Alter von 12 Monaten
und deren Mütter in Relation zu Größe, Gewicht und verschie-
denen biochemischen Parametern im Urin
Dissertation LMU München 1982
- 49 Klotz TA; Cohn LS; Zipser RD;
Urinary excretion of thromboxane B2 in patients with venous
thromboembolic disease
Chest 85; 329-335; (1984)

- 50 Knitza R; Wisser J; Meier H; Permanetter W; Sunder-
Plassmann L; Pfeiffer A;
Rezidivierender menstruationsassoziierter Pneumothorax / cata-
menial pneumothorax
Geburtsh. u. Frauenheilk.; 1; 57-60; (1987)
- 51 Kohler TR; Kaufmann JL; Kacoyanis G; Clowes A; Donaldson
MC; Kelly E; Skillman J; Couch NP; Whittemore AD; Mannick
JA; Salzman EW;
Effect of aspirin and dipyridamole on the patency of lower
extremity bypass grafts
Surgery 96; 3; 462-466; (1983)
- 52 Kromann N; Green A;
Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland
Acta Med. Scand. 208; 401-6; (1980)
- 53 Kukovetz WR; Holzmann S;
Der Wirkungsmechanismus von Molsidomin und Nitraten
Med. Praxis Sondernr. 1; 12-7; (1984)
- 54 Lapetina EG;
Regulation of arachidonic acid production: role of phospholipa-
ses C and A2
Trends in Pharmacol. Sci. 3; 3; 114-115; (1982)
- 55 Lapetina EG; Siess W;
The role of phospholipase C in platelet responses
Life Sci. 33; 11; 1011-1018; (1983)
- 56 Lawson JA; Brash AR; Doran J; FitzGerald GA
Measurement of urinary 2,3 dinor-thromboxane B2 and thrombo-
xane B2 using bonded-phase phenyl boronic acid columns and
capillary gas chromatography-negative ion chemical ioniza-
tion mass-spectrometry
Anal. Bioch. 150; 463-470; (1985)

- 57 Levin RI; Jaffe EA; Weksler BB; Tack-Goldman K;
Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by
cultured human endothelial cells
J. Clin. Invest. 67; 762-769; (1981)
- 58 Lorenz RL; Fischer S; Wober W; Wagner H; Weber PC;
Effects on prostanoid formation and pharmacokinetics of daz-
megrel (UK-38,485), a novel thromboxane synthetase inhibitor,
in man
Biochem. Pharmacol. 35; 5; 761-766; (1986)
- 59 Lorenz RL; v. Schacky C; Weber M; Meister W; Kotzur J;
Reichart B; Theisen K; Weber PC;
Improved aortocoronary bypass patency by low dose aspirin
(100 mg daily)
Lancet 1; 1261-1264; (1984)
- 60 Lorenz RL; Spengler U; Fischer S; Duhm J; Weber PC;
Platelet function, thromboxane formation and blood pressure
control during supplementation of the western diet with cod
liver oil
Circulation 67; 3; 504-511; (1983)
- 61 Maas RL; Roberts LJ; Taber DF; Oates JA;
Urinary dinor-thromboxane B2: levels in normal males and in
cardiovascular disease
Clin. Res. 28; 319A; (1980)
- 62 Marcus AJ;
Aspirin as an antithrombotic medication
New Engl. Journ. Med. 309; 24; 1515-1516; (1983)
- 63 Masotti G; Galanti G; Poggesi L; Abbate R; NeriSerneri GG;
Differential inhibition of prostacyclin production and platelet
aggregation by aspirin
Lancet 2; 1213-1216; (1979)

- 64 Metha P; Metha J;
Effects of smoking on platelets and on plasma thromboxane-
prostacyclin balance in man
Prostaglandins, Leukotrienes and Med. 9; 141-150; (1982)
- 65 Moncada S;
Biology and therapeutic potential of prostacyclin
Stroke 14; 2; 157-168; (1983)
- 66 Moncada S; Bunting S; Mullane K; Thorogood P; Vane JR;
Imidazole: a selective potent antagonist of thromboxane
synthetase
Prostagl. 13; 611-618; (1977)
- 67 Moncada S; Gryglewske RJ; Bunting S; Vane JR;
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin=
endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet
aggregation
Nature 263; 5579; 663-665; (1976)
- 68 Moncada S; Korbout R; Bunting S; Vane JR;
Prostacyclin is a circulating hormone
Nature 273; 767-768; (1978)
- 69 Moncada S; Vane JR;
Prostacyclin in perspective
in: Prostacyclin; ed. by Vane JR; Bergström S; Raven Press;
New York; (1979)
- 69a Moncada S; Vane JR;
Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in
haemostasis and thrombosis
Br. Med. Bull. 34; 2; 129-135; (1978)

- 70 Moncada S; Vane JR;
The role of prostacyclin in vascular tissues
Fed. Proc. 38; 62-6; (1979)
- 71 Nadler JL; Velasco JS; Horton R;
Cigarette smoking inhibits prostacyclin formation
Lancet 1; 1248-1250; (1983)
- 72 Needleman P; Holmberg S; Mandelbaum B;
Ductus arteriosus closure may result from suppression of
Prostacyclin synthetase by an intrinsic hydroperoxy fatty acid
Prostaglandins 22; 4; 675-682; (1981)
- 73 Needleman P; Minkes M; Raz A;
Thromboxane: Selective biosynthesis and distinct biological
properties
Science 193; 163-165; (1976)
- 74 Needleman P; Moncada S; Bunting S; Vane JR; Hamberg M;
 Samuelsson B;
Identification of an enzyme in platelet microsomes which
generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides
Nature 261; 558-60; (1976)
- 75 Needleman P; Raz A; Minkes M; Ferrendelli JA; Sprecher H;
Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis
and unique biological properties
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76; 944-948; (1979)
- 76 Nunez L; GilAguado M; Larrea JL; Celemi D; Oliver J;
Prevention of thromboembolism using aspirin after mitral valve
replacement with porcine bioprosthesis
Ann. Thor. Surg. 37; 1; 84-87; (1984)

- 77 Orchard MA; Robinson C;
Stability of Prostacyclin in human plasma and whole blood:
studies on the protective effect of albumin
Thromb. Haemostas. 46; 3; 645-647; (1981)
- 78 Pace-Asciak C;
Isolation and biosynthesis of 6 keto-prostaglandin Fl α in
the rat stomach
Journ. Am. Chem. Soc. 98; 2348-2349; (1976)
- 79 Packham MA;
Mode of action of acetylsalicylic acid
in: ASA: New Uses for an Old Drug; ed. by Barnett HJM; Hirsh J;
Mustard JF; Raven Press; New York; 63-82; (1982)
- 80 Patrono C; Ciabattoni G; Pinca E; Pugilese F; Casrucci G;
DeSalvo A; Satta MA; Peskar BA;
Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production
in healthy subjects
Thrombos. Res. 17; 317-327; (1980)
- 81 Patrono C; Pugilese F; Ciabattoni G; Patrignani P;
Maser A; Cherchia S; Peskar B; Cinotti G; Simonetti B;
Pierucci A;
Evidence for a direct stimulatory effect of prostacyclin on
renin release in man
J. Clin. Invest. 69; 231-239; (1982)
- 82 Pedersen AK; FitzGerald GA;
Dose-related kinetics of aspirin; Presystemic acetylation of
platelet cyclooxygenase
New Engl. Journ. Med. 311; 19; 1206-1211; (1984)

- 83 Philip RB; Paul ML;
Low-dose aspirin (ASA) renders human platelets more vulnerable
to inhibition of aggregation by prostacyclin (PGI₂)
Prostagl. Leukotr. Med. 11; 131-142; (1983)
- 84 Piper PJ; Vane JR;
Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism
by antiinflammatory drugs
Nature; 223; 29-35; (1969)
- 85 Reines HD; Halushka PV; Cook JA; Wise WC; Rambo W;
Plasma thromboxane concentrations are raised in patients
dying with septic shock
Lancet 2; 174-175; (1982)
- 86 Roberts J; Sweetman B; Payne A; Oates J;
Metabolism of TXB₂ in man; Identification of the major urinary
metabolite
Journ. Biol. Chem. 252; 21; 7415-7417; (1977)
- 87 Roberts J; Sweetman B; Oates J;
Metabolism of TXB₂ in man; Identification of 20 urinary metabolites
Journ. Biol. Chem. 256; 16; 8384-8393; (1981)
- 88 Robertson RM; Robertson D; Roberts J; Maas RL; FitzGerald
GA; Friesinger GC; Oates JA;
Thromboxane in vasotonic angina pectoris
New Engl. Journ. Med. 304; 17; 998-1003; (1981)
- 89 Rogers SP; Larkins RG;
Production of 6oxoPGF_{1α} by rat aorta; influence of diabetes,
insulin treatment and caloric deprivation
Diabetes 30; 11; 935-939; (1981)

- 90 Rosenkranz B; Fischer C; Reimann I; Weimer KE; Beck G;
 Frölich JC;
Identification of the major urinary metabolite of prostacyclin
and 6 keto PGF_{1α} in man
Biochim. Biophys. Acta 619; 207-213; (1980)
- 91 Rosenkranz B; Fischer C; Frölich JC;
Prostacyclin metabolites in human plasma
Clin. Pharmacol. Ther. 29; 3; 420-424; (1981)
- 92 Rosenkranz B; Fischer C; Weimer KE; Frölich JC;
Metabolism of prostacyclin and 6 keto-PGF_{1α} in man
Journ. Biol. Chem. 255; 21; 10194-10198; (1980)
- 93 Roth GJ; Majerus PW;
The mechanism of the effect of aspirin on human platelets
J. Clin. Invest. 56; 624-632; (1975)
- 94 Roth P;
Thrombozytenaggregation und Thromboxanbildung beim Menschen;
Physiologische, pharmakologische und nutritive Beeinflussung
Dissertation LMU München (1982)
- 95 Rybicki JP; Venton DL; Le Breton GC;
The thromboxane antagonist, 13azaprostanoic acid inhibits
arachidonic acid induced Ca⁺⁺ release from isolated platelet
membrane vesicles
Bioch. Biophys. Acta 751; 66-73; (1983)
- 97 Scherer B; Weber PC;
Urinary prostaglandins in the newborn: Relationship to urinary
osmolality, urinary potassium and blood pressure
Adv. Prostagl. Thrombox. Res. 7; ed. by Samuelsson B; Ramwell PW;
Paoletti R; Raven Press; New York; (1980)

- 98 Shelton JD;
Prostacyclin from the uterus and woman's cardiovascular
advantage
Prostagl; Leukotr. and Med. 8; 459-466; (1982)
- 99 Siess W; Dray F;
Very low levels of 6 keto PGF $_{1\alpha}$ in human plasma
Journ. Lab. Clin. Med. 99; 388-398; (1982)
- 100 Siess W; Roth P; Scherer B; Kurzmann I; Böhlig B;
 Weber PC;
Platelet membrane fatty acids, platelet aggregation and
thromboxane formation during a mackerel diet
Lancet 1; 441-4; (1980)
- 101 Siess W; Roth P; Weber PC;
Stimulated platelet aggregation, thromboxane B₂ formation and
platelet sensitivity to prostacyclin - a critical evaluation
Thromb. Haemostas. 45; 204-7; (1981)
- 102 Silberbauer K; Schernthaler G; Sinzinger H; Piza-Katzer
 H; Winter M;
Decreased vascular prostacyclin in juvenile-onset diabetes
New Engl. Journ. Med. 300; 7; 366-367; (1979)
- 103 Simrick R; Spahn H; Breddin HK; Mutschler E;
Reversible Hemmung der Thrombozytenstimulation durch Azetyl-
salizylsäure und ihre Bedeutung für die antithrombotische
Therapie
Kli. Wo. 61; 297-302; (1983)
- 104 Stoel I; v.d. Giessen WJ; Zwolsman E; Verheugt FWA;
 ten Hoor F; Quadt FJA; Hugenholtz PG;
Effect of nicotine on production of prostacyclin in human
umbilical artery
Br. Heart Journ. 48; 493-496; (1982)

- 105 Stuart MJ; Sunderji SG; Suny JBA;
Decreased prostacyclin or PGI₂ production in the infant of
the diabetic mother
Thrombos. Haemostas. 46; 1; 274; (1981)
- 106 Sun F; Taylor B; McGuire J; Wong P; Malik K; McGiff J;
Metabolic disposition of prostacyclin
Prostacyclin; ed. by Vane JR; Bergström S; Raven Press; New York;
(1979)
- 106a Tateson JE; Moncada S; Vane JR;
Effects of Prostacyclin (PGI₂) on cyclic AMP concentrations
in human platelets
Prostaglandins 13; 389-399; (1977)
- 107 The Coronary Drug Project Research Group
The coronary drug project; Findings leading to discontinuation
of the 2,5mg/day estrogen group
JAMA 226; 6; 652-657; (1973)
- 108 — Vesterquist O; Green K;
Urinary excretion of 2,3 dinor-thromboxane B₂ in man under normal
conditions, following drugs and during some pathological conditions
Prostaglandins 27; 4; 627-644; (1984)
- 109 Walinsky P; Smitz B; Lefer A; Lebenthal M; Urban P;
 Greenspon A; Goldberg S;
Thromboxane A₂ and acute myocardial infarction
Am. Heart Journ. 108; 4; 1; 868-872; (1984)
- 110 Weber PC;
w-3-Fettsäuren aus Fisch: Zellfunktionen, Gesundheit
Dt. Ärztebl. 82; 49; 3688-3689; (1985)

- 111 Weber PC; Siess W;
Interactions of renal prostaglandins with the renin-angio-
tensin system
Pharmacol. Ther. 15; 321-337; (1982)
- 112 Weber PC; Siess W; Lorenz R; Witzgall H; Scherer B;
A possible role of arachidonic acid metabolites in essential
hypertension
Prostagl. and the kidney; ed. by Dunn MJ; Patrono C; Cinotti
GA; Plenum Med. Book Comp; New York, London; Kap. 35; 375-
383; (1983)
- 113 Weber PC; Siess W; Scherer B;
Vaskuläre, thrombozytäre und renale Prostaglandine; Bio-
chemie, Funktion, klinische Aspekte
Kli. Wo. 57; 425-444; (1979)
- 114 Weber PC; Siess W; Scherer B; Held E; Witzgall H;
Lorenz R;
Arachidonic acid metabolites, hypertension and arterioscle-
rosis
Kli. Wo. 60; 479-488; (1982)
- 115 Wennmalm A;
Effects of nicotine on cardiac prostaglandin and platelet
thromboxane synthesis
Br. Journ. Pharmacol. 64; 559-563; (1978)
- 116 Wennmalm A;
Interaction of nicotine and prostaglandins in the cardio-
vascular system (Minireview)
Prostaglandins 23; 1; 139-144; (1982)
- 117 Wennmalm A; Alster P;
Nicotine inhibits vascular prostacyclin but not platelet
thromboxane formation
Gen. Pharmacol. 14; 189-191; (1983)

118 Whorton AR; Misono K; Hollifield J; Frölich JC;
Inagami T; Oates JA;

Prostaglandins and renin release: Stimulation of renin release
from rabbit renal cortical slices by Prostacyclin
Prostaglandins 14; 1095-1104; (1977)

DANKSAGUNG

Allen Mitarbeitern des nephrologischen Labors danke ich herzlich für ihre Unterstützung und für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Besonders danken möchte ich Frau E. Schmidt, Frau B. Zimmer, Frau B. Böhlig und Herrn U. Katzner für Einarbeitung und Hilfestellung bei verschiedenen Messverfahren, sowie Frau M. Nirschel für die konstante Versorgung mit sauberen Laborgerätschaften.

Herrn Th. Strasser danke ich für wertvolle Anregungen und kritische Diskussionen.

Herrn Dr. S. Fischer und Herrn Dr. R. Lorenz möchte ich meinen Dank aussprechen für kritische Durchsicht des Manuskripts.

Außerdem gilt mein Dank all denen, die Urin oder Blut zur Verfügung gestellt haben, sowie allen, die mir bei der Gewinnung der Proben behilflich waren.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. P. C. Weber für die Überlassung des Themas und für seine Beratung und Unterstützung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. E. Buchborn danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten innerhalb der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Lebenslauf

Hubert Moritz Meier

Geburtsdatum und -ort

14. Mai 1960

München

Ausbildungsgang:

1966-68	Grundschule an der Farinellistraße, München
1968-70	Grundschule an der Herrnstraße, München
1970-79	Luitpold-Gymnasium, München
1979	Abitur
1979-80	Grundwehrdienst
WS 1980/81	Tiermedizin an der LMU München
SS 1981-SS 1986	Humanmedizin an der LMU München
August 1982	ärztliche Vorprüfung
August 1983	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 1985	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 1986	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 1.12.1986	Assistenzarzt der chirurgischen Abteilung des Marien-Hospitals, Düsseldorf

